

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

DISCIPLINE : SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE : BACTERIOLOGIE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES AGREGATS BIFIDES :
SELECTION, CARACTERISATION, MECANISME
ET PREVENTION DU DIABETE DE TYPE 1**

PRESENTEE ET SOUTENUE PAR :

ANGELO SCUOTTO

LE 30 JUIN 2015

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

PR FRÉDÉRIC GOTTRAND
DR CATHÉRINE DEMAILLY - MULLIÉ
DR VANESSA LIEVIN - LE MOAL
PR MARIE-BENEDICTE ROMOND

PRESIDENT
RAPPORTEUR
RAPPORTEUR
DIRECTRICE DE THESE



Contribution à l'étude des agrégats bifides :
sélection, caractérisation, mécanisme
et prévention du diabète de type 1

Remerciements

Cette thèse est le fruit du travail de recherche mené en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie-Virologie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l' Université Lille Nord de France, l'équipe d'accueil EA3610 Pathogenèse virale du diabète de type 1, et la société BIFINOVE.

Je remercie tout d'abord l'ANRT et la société BIFINOVE pour leur soutien financier.

Aussi, mes remerciements vont à toutes les personnes qui m'ont guidées et soutenu durant ces quatre dernières années :

- Au Professeur Marie Bénédicte Romond de m'avoir proposé ce sujet de thèse, de m'avoir aidé à trouver les financements et d'avoir dirigé mes travaux. J'ai beaucoup appris à vos côtés pendant ces quatre années. Votre expérience, votre rigueur intellectuelle et votre disponibilité ont été des atouts indispensables à l'élaboration de cette thèse. Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.
- Au professeur Didier Hober, directeur de l'EA3610, pour toute la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son équipe et d'avoir mis à ma disposition ses infrastructures et son expertise scientifique.
- Au Professeur Frédéric Gottrand pour avoir accepté de présider cette soutenance de Thèse.
- Au Docteur Catherine Demailly-Mullié d'avoir participé à mes Comités de Suivi de thèse et pour l'honneur que vous me faite en acceptant de juger ce travail et d'en être rapportrice.
- Au Docteur Vanessa Liévin-Le Moal pour l'honneur que vous me faite en acceptant de juger ce travail et d'en être rapportrice.
- A toute l'équipe de BIFINOVE, en particulier à Frédéric, Soune, Michel et Corinne. Vous m'avez permis de m'intégrer rapidement au sein du laboratoire. Votre soutien technique et

morale ainsi que vos conseils avisés et toujours bienveillants m'ont été d'une aide inestimable et ont grandement contribué à l'élaboration de cette thèse. Je vous en suis très reconnaissant.

- A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie et Virologie de la faculté de pharmacie et en particulier à Marie, Séverine, Carole, Elisabeth, Vanessa et Isabelle pour leur patience (et tous les autoclaves).

- A toute l'équipe du laboratoire de Virologie pour l'accueil, leurs conseils techniques et scientifiques. Un grand merci à Famara pour sa disponibilité et son expertise scientifique.

- A ma mère pour qui les mots me manquent tant son soutien sans faille a toujours été un moteur dans tout ce que j'ai entrepris. Grâce à ses sacrifices, j'ai pu arriver là où je suis. Je lui en suis infiniment reconnaissant.

- A ma compagne, Lucie, pour sa patience et tout le réconfort qu'elle a su m'apporter sans relâche au quotidien. La solidité de notre couple n'a cessé de croître au cours de ces dix dernières années et m'a permis d'aller sereinement au bout de cette aventure scientifique.

- A toute ma famille, et mes amis, sur qui j'ai toujours pu compter dans tous les moments importants de ma vie. Je vous remercie pour votre joie de vivre et votre affection maintes fois renouvelée.

Résumé

Certaines souches de bifidobactéries entrent dans la composition de laits infantiles. Leurs propriétés (modulation du microbiome, régulation de la translocation bactérienne, maturation de cellules dendritiques) sont liées à la capacité de sécrétion de composés de haut poids moléculaire lors de la fermentation bactérienne. Les objectifs de ce travail sont, dans un premier temps, de caractériser les molécules issues de la fermentation de la souche de référence *B.breve* C50, et de déterminer si d'autres bifidobactéries peuvent sécréter des molécules de propriétés similaires. Les analyses associant chromatographie gazeuse (GC), spectrométrie de masse (MS), électrophorèse, séquençage protéique montrent que les composés fermentaires de *B.breve* C50 sont des agrégats (>600kDa) associant des unités lipoprotéiques de la paroi cellulaire contenant un domaine CHAP et des sucres, en majorité du glucose. Ces agrégats sont reconnus par le TLR6, indiquant une structure lipoprotéique di-acylée. Ils sont également ligand de la galectine 1, ce qui suggère que les hexosamines et le galactose détectés par GC sont exposés à l'extérieur des agrégats. L'analyse *in silico* des homologies avec le gène codant pour la séquence protéique révèle la proximité du gène de *B.longum* avec *B.breve*. Par contre, il est peu probable que *B.bifidum* sécrète des agrégats semblables, la séquence du gène homologue étant dépourvu de lipobox. Les agrégats (>600 kDa), isolés après fermentation de la souche *B.longum* CBi0703 dans le milieu lacté de référence, montrent une composition similaire (unités lipoprotéique associées à des sucres, en majorité du glucose et du mannose), une reconnaissance par la galectine 1 mais non par le TLR6. La différence de composition en lipide et l'hydrophobicité de la séquence protéique semble prévenir la reconnaissance de la structure lipoprotéique par le récepteur TLR6. Les agrégats de *B.longum* ayant montré des propriétés anti-inflammatoires, l'hypothèse d'une

phagocytose a été explorée dans un deuxième temps. Les agrégats marqués par des marqueurs fluorescents ne sont pas détectés dans les cellules après contact direct (*ex-vivo*) ou gavage des animaux (*in vivo*). Une capture des agrégats par les cellules présentatrices d'antigènes est donc peu probable. La reconnaissance par la galectine 1 des deux types d'agrégats bifides nous fait privilégier la piste d'un mécanisme de régulation de la translocation du microbiome par l'intermédiaire des structures hexosamines et galactose exposées à la surface des agrégats. Dans un troisième temps, l'implication des agrégats bifides dans la prévention du diabète de type 1 a été explorée. En effet, le lait de femme prévient la survenue du diabète chez les souris NOD. La recherche par PCR du gène codant pour la lipoprotéine d'intérêt a permis la détection de *B.longum* dans 21 échantillons de lait maternel sur 33 (soit 12 mamans parmi 16). A l'inverse, *B.breve* est rarement isolé (2 mamans parmi 16). Comme l'analyse transcriptomique indique que les lipoprotéines sont synthétisées de façon continue, elles peuvent donc être sécrétées par les bifidobactéries dans le lait de femme. Aussi le choix s'est porté sur les agrégats de *B.longum*, testés à une dose anti-inflammatoire en prévention anti-diabétique. Si l'administration de lait maternel réduit l'incidence du DT1 chez des souris NOD âgées de plus de 18 semaines ($p < 0.001$), c'est au contraire une protection précoce mais qui ne persiste pas qui est observée sous agrégats bifides. L'effet protecteur est observé en absence de bifidobactéries intestinales. Les agrégats bifides à la dose anti-inflammatoire ne modulent pas à la même vitesse les bactéries intestinales sensibles au lait de femme, ce qui pourrait expliquer le retard d'apparition des premiers diabètes lors du traitement.

Summary

Some bifidobacterial strains are used to ferment infant formulas. Their properties (modulation of microbiome, regulation of bacterial translocation, dendritic cells maturation) are related to their ability to secrete high molecular weight compounds during the bacterial fermentation. The first objective of the study was to characterize the molecules secreted by the strain *B.breve* C50 used as a reference, and to determine whether other bifidobacteria can secrete molecules with similar properties. Analysis using gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS), electrophoresis, protein sequencing showed that the *B.breve* C50 fermentation compounds are constituted of aggregates (>600kDa) combining units of a cell wall lipoprotein with a CHAP domain and sugars moities, mostly glucose. The aggregates are recognized by TLR6, indicating that the protein was diacetylated. They are also ligand of the galectin 1, suggesting that the hexosamine and galactose moities detected by GC surrounded the aggregates. *In silico analysis* showed that a *B.longum* gene exhibiting a high homology with the *B.breve* C50 gene, coded for a lipoprotein, which was secreted during fermentation, and formed aggregates with sugars. *B.bifidum* species likely does not secrete similar aggregates since the sequence of the homologous gene is deprived of lipobox. *B.longum* CBi0703 and *B.breve* C50 aggregates shared the same global structure (lipoproteins with CHAP domain bordered by sugars primarily constituted of glucose and mannose). Remarkably, the CBi0703 aggregates were also able to bind Gal-1 but were lacking binding capacities to TLR6. It is likely that the hydrophobicity of the protein sequence, as well as the lipid and sugar compositions prevented the recognition of the lipoprotein structure by the TLR6 receptor. Secondly, a putative phagocytosis of aggregates was investigated. Fluorescent-labeled aggregates are not detected within cells after direct contact (*ex-vivo*) or

oral challenge in animals (*in vivo*). Capture of the aggregates by antigen presenting cells seemed improbable. The two types of aggregates being recognized by galectin-1, regulation of the intestinal bacterial translocation by the aggregates likely involves the hexosamines and galactose surrounding their surface. In a third step, the possible involvement of the bifidobacterial aggregates in the prevention of type 1 diabetes was investigated. Actually, breast milk was previously shown to prevent diabetes onset in old NOD mice. Detection of bifidobacteria using amplification of the gene encoding the *B.longum* lipoprotein was positive in 21 human milk samples out of 31 (i.e. 12 mothers out of 16). Conversely, *B.breve* is rarely isolated (2/16 mothers). Since transcriptomic analysis showed that the lipoproteins were continuously synthesized, we hypothesized that the bifidobacterial aggregates were secreted by the bifidobacteria harbored in human milk. To ensure that *B.longum* aggregates play a role in the protection induced by human milk, they were assayed at an anti-inflammatory dose. Contrary to breast milk which reduced the incidence of T1D in NOD mice older than 18 weeks ($p < 0.001$), only early but not persistent protection is observed during bifidobacterial aggregates intake. The protective effect was observed in the absence of intestinal bifidobacteria. Variation in intestinal bacterial colonization did not match in groups drinking human milk or bifidobacterial aggregates at an inflammatory dose. The difference in kinetics could support the delay in diabetes onset induced by the bifidobacterial aggregates.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	14
Liste des figures	16
Liste des tableaux	18

CHAPITRE 1 : Etude Bibliographique..... 19

1.1 Les bifidobactéries.....	19
1.1.1 Taxonomie et caractères généraux	19
1.1.1.1 <i>Historique et Taxonomie</i>	19
1.1.1.2 <i>Genre</i>	19
1.1.1.3 <i>Espèces</i>	21
1.1.2. Composition de la paroi des bifidobactéries.....	24
1.1.2.1 <i>Peptidoglycane</i>	24
1.1.2.2 <i>Acide lipoteichoïque</i>	24
1.1.2.3 <i>Protéines de la paroi</i>	25
1.1.2.4 <i>EPS</i>	29
1.1.3 Physiologie	29
1.1.3.1 <i>Métabolisme</i>	29
1.1.3.2 <i>Facteurs physiques et chimiques modulant la physiologie bifide</i>	32
1.1.3.3 <i>Facteurs génétiques pouvant moduler la physiologie bifide</i>	34
1.1.4 Ecologie	36
1.1.4.1 <i>Niches écologiques</i>	36
1.1.4.2 <i>Colonisation intestinale</i>	37
1.2 Prévention du diabète de type 1	39
1.2.1 Epidémiologie et symptomatologie	39
1.2.2 Facteurs étiologiques	40
1.2.2.1 <i>Prédisposition génétique</i>	40
1.2.2.2 <i>Virus diabétogènes</i>	42
1.2.2.3 <i>Théorie hygiéniste</i>	43
1.2.2.4 <i>Microbiote intestinal et DTI</i>	43
1.2.3 Contribution des études chez l'animal.....	48
1.2.3.1 <i>Le modèle NOD</i>	49
1.2.3.2 <i>Génétique des souris NOD</i>	49
1.2.3.3 <i>Mécanisme cellulaire d'initiation du DTI chez les NOD</i>	49
1.2.3.4 <i>Influence du microbiote chez les souris NOD</i>	50
1.3 Probiotiques, prébiotiques et métabolites fermentaires	52
1.3.1 Probiotiques	52
1.3.2 Prébiotiques	54
1.3.3 Métabiotiques	55

Conclusion.....	58
-----------------	----

Objectifs	59
-----------------	----

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules bifides 60

2.1 Caractérisation des molécules de *B.breve* C50..... 60

2.1.1 Résumé	60
--------------------	----

2.1.2 Introduction	61
--------------------------	----

2.1.3 Matériels et Méthodes	63
-----------------------------------	----

2.1.3.1 Production du surnageant de <i>B.breve</i> C50	63
--	----

2.1.3.2 Isolement des composés bifides	64
--	----

2.1.3.3 Dosage ELISA	64
----------------------------	----

2.1.3.4 Analyse des protéines	65
-------------------------------------	----

2.1.3.5 Extraction d'ADN et amplifications	66
--	----

2.1.3.6 Analyse des sucres et des lipides	67
---	----

2.1.3.7 Outils bioinformatiques	68
---------------------------------------	----

2.1.3.8 Numéro d'accension	68
----------------------------------	----

2.1.4 Résultats.....	69
----------------------	----

2.1.5 Discussion.....	78
-----------------------	----

2.2 Recherche de lipoprotéines avec un domaine CHAP chez d'autres bifidobactéries.. 85

2.2.1 Résumé (Fig.14)	85
-----------------------------	----

2.2.2 Introduction	87
--------------------------	----

2.2.3 Matériels et Méthodes	89
-----------------------------------	----

2.2.3.1 Analyse in-silico	89
---------------------------------	----

2.2.3.2 Souches bactériennes et conditions de culture	89
---	----

2.2.3.3 Isolement des composés bifides	90
--	----

2.2.3.4 Dosages par technique ELISA.....	90
--	----

2.2.3.5 Analyse de la protéine	91
--------------------------------------	----

2.2.3.6 Extraction d'ADN et amplifications	92
--	----

2.2.3.7 Analyse des sucres et des lipides	94
---	----

2.2.4 Résultats et discussion	94
-------------------------------------	----

2.2.4.1 Les séquences les plus proches de <i>B.breve</i> C50 appartiennent à <i>B.longum</i>	94
---	----

2.2.4.2 La sécrétion des composés bifides de haut poids moléculaire (BC) diffère selon les souches de <i>B.longum</i>	97
---	----

2.2.4.3 La souche <i>B.longum</i> CBi0703 secrète des BCs sous forme agrégée	98
--	----

2.2.4.4 Les agrégats de <i>B.longum</i> contiennent une protéine présentant une séquence similaire à celle de la lipoprotéine de <i>B.breve</i> C50	102
---	-----

2.2.4.5 Comme pour <i>B.breve</i> C50, les composés bifides CBi0703 _{BC} contiennent des lipides et des sucres mais ne sont pas reconnus par le TLR6	103
---	-----

2.2.5 Conclusion	109
------------------------	-----

2.2.6 Données complémentaires	109
-------------------------------------	-----

CHAPITRE 3 : Mécanisme d'action des composés bifides 111

3.1 Objectifs de l'étude.....	111
3.2 Matériel et méthodes	113
3.2.1 Marquage des agrégats et des extraits de milieu de culture	113
3.2.2.1 Animaux.....	114
3.2.2.2 Préparation des suspensions cellulaires	115
3.2.3 Analyse par Microscopie à fluorescence	115
3.2.3.1 Animaux.....	115
3.2.3.2 Préparation des suspensions cellulaires (essai <i>ex vivo</i>)	116
3.2.3.3 Préparation des suspensions cellulaires (essai <i>in vivo</i>).....	116
3.2.4 Analyse par cytométrie de flux.....	117
3.2.4.1 Animaux.....	117
3.2.4.2 Banc optique.....	117
3.2.4.3 Analyses statistiques.....	119
3.2.5 Amplification génique	119
3.2.6 Translocation bactérienne après traitement par les agrégats bifides	120
3.3 Résultats	122
3.3.1 Mise au point de la méthode.....	122
3.3.2 Essai <i>ex-vivo</i> (analyse par microscope à fluorescence)	123
3.3.3 Essais <i>in vivo</i>	124
3.3.3.1 Analyse par microscope à fluorescence	124
3.3.3.2 Analyse par FACs.....	128
3.3.4 Capture des bifidobactéries mortes alimentaires	132
3.3.5 Translocation bactérienne.....	133
3.4 Discussion	135

CHAPITRE 4 : Recherche des agrégats bifides dans le lait maternel et efficacité anti-diabétique dans le modèle NOD 141

4.1 Objectifs	141
4.2 Quantification des bifidobactéries et de leurs composés dans le lait maternel.....	142
4.2.1 Préambule	142
4.2.2.1 Echantillons.....	143
4.2.2.2 Extraction d'ADN à partir des échantillons de lait	143
4.2.2.3 Quantification par amplification génique en temps réel.....	143
4.2.2 Résultats.....	145
4.2.3 Conclusion	146
4.3 Efficacité des composés BI CBI0703_{BC} et modulation de la flore	148
4.3.1 Préambule	148
4.3.2 Matériel et méthodes	148
4.3.2.1 Animaux et conception de l'étude.....	148
4.3.2.2 Suivi de la glycémie.....	149
4.3.2.3 Prélèvements.	149

4.3.2.4 <i>Quantification des bactéries intestinales.</i>	149
4.4.2.5 <i>Analyse statistique.</i>	150
4.3.3 Résultats.....	150
4.3.3.1 <i>Prévention du DTI</i>	150
4.3.3.2 <i>Modulation de la flore</i>	152
4.3.4 Discussion.....	157
Conclusion générale - perspectives	161
Références bibliographiques	163
Annexes	183

Liste des abréviations

ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BC	Composés bifides
BI CBI0703 _{BC}	Composé bifides issue de la fermentation de la souche <i>B.longum</i> CBI0703
BLAST	Basic local alignment search tool
BLIF	protéine recombinante de <i>B.longum</i>
CD	Cellules dendritiques
CHAP	Cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
D-	non diabétique
D+	diabétique
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DT1	diabète de type 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EP	pic exclu
EPS	exopolysaccharide
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Gal-1	Galectine 1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GC	Chromatographie phase gazeuse
GF	Gel filtration
GF	Germ-free
GOS	Galacto-oligosaccharides
HLA	Human leukocyte antigen
HMO	Human milk oligosaccharide
HSP	Heat shock protein
IFN	Interferon
IL	Interleukine

LacNAc N-acétyllactosamine
LF Lait de femme
LPS Lipopolysaccharide
LT Lymphocyte T
LTA Acide lipotéichoïque
MALDI Matrix-assisted laser desorption/ionisation
mPDCA Cellule dendritique plasmacytoïde
MS Spectrométrie de masse
NCBI National center for biotechnology information
ND Non-détectable
NOD Non obese diabetic
PB Pacific blue™
PCR Polymerase chain reaction
pH Potentiel hydrogen
qPCR PCR quantitative
RF Fermentation régulée
RP Pic retenu
Rt Temps de rétention
RT-PCR Retrotranscription-PCR
SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SN Surnageant
TLR Toll like receptor
TNF Tumor necrosis factor
UFC Unité formant colonie
URF Fermentation non-régulée
 α -LA Alpha-lactalbumine

Liste des figures

CHAPITRE 1 : Etude Bibliographique

Fig. 1 : Arbre phylogénétique du genre *Bifidobacterium* basé sur la comparaison des séquences d'acides aminés BifCOG.

Fig. 2 : Dégradation des hexoses par la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase.

Fig. 3 : Arbre phylogénétique et niches écologiques principales de 45 espèces de *Bifidobacterium*.

Fig. 4 : Facteurs étiologiques du diabète de type 1.

Fig. 5 : Le modèle « perferct storm » et contribution du trio de facteurs intestinaux dans la pathogénèse du diabète de type 1.

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules bifides

Fig. 6 : Gel filtration de Bb C50_{SN} filtration.

Fig. 7 : Reconnaissance de Bb C50_{SN} et des fractions avec les TLR2/6.

Fig. 8 : Gel filtration de Bb C50_{BC} natif et après hydrolyse acide à chaud.

Fig. 9 : Analyses GC/FID et GC/MS-EI de Bb C50_{BC}.

Fig. 10 : Reconnaissance de Bb C50_{BC} avec les galectines 1 et 3.

Fig. 11 : Reconnaissance de Bb C50_{BC} avec la Gal-1 après chauffage et ultrafiltration.

Fig. 12 : Modélisation de la structure protéique de Bb C50_{BC}.

Fig. 13 : Représentation schématique de la sécrétion du complexe Bb C50_{BC} sous forme agrégée dans le milieu extracellulaire.

Fig. 14: Résumé graphique.

Fig. 15 : Alignement des séquences “peptide signal” des souches *B.longum* par rapport à la souche *B.breve* C50.

Fig. 16 : Gel filtration des surnageants de *B.longum*.

Fig. 17 : Stabilité de BI CBI0703_{BC} et ses fractions.

Fig. 18 : Détection de la protéine dans les agrégats par SDS-PAGE (A, B) et expression relative de son gène au cours de la fermentation (C).

Fig. 19: Spectres GC/FID et GC/MSeEI de BI CBI0703_{BC}.

Fig. S1: Alignement des séquences protéiques de *B.breve* C50 et de *B.longum* CBI0703.

Fig. S2 : Croissance des souches de *B.longum* CBi0703 et CBi0701 au cours du temps.

CHAPITRE 3 : Mécanisme d'action des composés bifides

Fig. 20 : Stratégies mises en place pour valider l'hypothèse de capture des agrégats bifides.

Fig. 21 : Stratégie d'analyse globale par cytométrie de flux.

Fig. 22 : Thymocytes après incubation en présence de BI CBi0703_{BC} marqué par le Pacific Blue.

Fig. 23 : Cellules de moelle osseuse après incubation en présence de BI CBi0703_{BC} marqué par le Pacific Blue.

Fig. 24 : Cellules CD11c+ sélectionnées par le système Miltenyi émettant une fluorescence bleue.

Fig. 25: Analyse de la fluorescence des suspensions cellulaires de moelle osseuse.

Fig. 26 : Taille/structure de la suspension totale de moelle osseuse d'une souris ayant reçu les agrégats bifides à 100µg/kg.

Fig.27 : Cellules CD11c+ sélectionnées par le système Miltenyi émettant une fluorescence bleue.

Fig. 28 : Passage des entérocoques vivants de la lumière intestinale vers le milieu intérieur.

Fig. 29 : Translocation de *L.johnsoni* en partie haute de l'iléon.

Fig. 30 : Invagination de la membrane plasmique cellulaire induite par une reconnaissance ligand récepteur entre la bactérie et la cellule.

Fig. 31 : Illustration de l'hypothèse du mécanisme d'action des agrégats bifides via l'interaction avec la galectine 1.

Fig. 32 : Illustration de l'hypothèse du mécanisme d'action des agrégats bifides via l'interaction les lectines bactériennes.

CHAPITRE 4 : Recherche des agrégats bifides dans le lait maternel et efficacité anti-diabétique dans le modèle NOD

Fig. 33 : Quantification des bifidobactéries dans les échantillons de lait maternel.

Fig. 34 : Incidence du diabète de type 1 chez les souris NOD.

Fig. 35: Variation des populations d'*E.coli* au cours de l'essai dans les différents groupes.

Fig. 36 : Variation des populations de *L.reuteri* au cours de l'essai au cours de l'étude.

Fig. 37 : Variation des *A.viridans* au cours du temps en fonction du régime alimentaire.

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 : Etude Bibliographique

Tableau 1 : Taxonomie de la famille des *Bifidobacteriaceae*.

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules bifides

Tableau 2 : Amorces utilisées dans cette étude.

Tableau 3 : BLASTP des peptides de Bb C50_{BC} trouvés en spectrométrie de masse.

Tableau 4: Prédictions bioinformatiques à partir de la séquence d'acide aminée de Bb C50_{BC}.

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisées dans cette étude.

Tableau 6: Analyse *in-silico* des séquences protéiques des espèces du genre *Bifidobacterium*.

Tableau 7 : BLASTP des peptides issus de BI CBI0703_{BC} retrouvés en spectrométrie de masse.

Tableau 8 : Reconnaissance de BI CBI0703_{BC} et de la fraction P1 par la Gal-1 et anti-BLIF en fonction de la régulation du pH au cours de la fermentation.

CHAPITRE 3 : Mécanisme d'action des composés bifides

Tableau 9 : Banc optique utilisé dans cette étude.

Tableau 10 : Couples d'amorces utilisées pour l'identification des souches.

Tableau 11 : Analyse des suspensions cellulaires de moelle osseuse présentant une fluorescence bleue par cytométrie de flux.

Tableau 12 : Analyses des cellules dendritiques Cd11c+ présentant une fluorescence bleue

CHAPITRE 4 : Recherche des agrégats bifides dans le lait maternel et efficacité anti-diabétique dans le modèle NOD

Tableau 13 : Couples d'amorces utilisés pour quantifier les bifidobactéries dans les échantillons de lait maternel.

CHAPITRE 1 : Etude Bibliographique

1.1 Les bifidobactéries

1.1.1 Taxonomie et caractères généraux

1.1.1.1 Historique et Taxonomie

En 1899, Tissier met en évidence des bacilles à Gram positif légèrement infléchis, souvent sous forme bifide, provenant de matières fécales de nourrissons allaités au sein. Il donne à l'espèce type le nom de *Bacillus bifidus communis* (Tissier, 1900). Les *Bifidobacterium* apparaissent après coloration de Gram comme des bacilles à Gram positif, asporogènes et immobiles. Leur nom vient de la forme à deux branches en Y ou en V qu'ils peuvent présenter sous certaines conditions de culture (Poupard et al., 1973). Leurs extrémités sont effilées, bifurquées ou spatulées. Ils peuvent aussi se présenter sous forme de bacilles réguliers ou sous forme de coccoïde. Ce polymorphisme est en relation étroite avec la composition du milieu de culture (Kojima et al., 1968). Elles peuvent être observées sous forme isolée ou sous forme associée en chainettes ou en amas, et sont catalase négative pour la plupart d'entre-elles (Felis & Dellaglio, 2007).

1.1.1.2 Genre

La dénomination du genre *Bifidobacterium* est proposée par Orla-Jensen en 1924. Cependant, du fait de leurs nombreuses ressemblances morphologiques et physiologiques, les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ont longtemps été réunis. Ce n'est qu'en 1974, que le genre *Bifidobacterium* est introduit et reconnu dans la classification systématique dans la 8^{ème}

édition du Bergey's manual of systematic bacteriology (Buchanan & Gibbons, 1972). Leur génome est caractérisé par un pourcentage élevé en Guanine-Cytosine (GC%) compris entre 50 et 67 % (Mattarelli et al., 2014).

Taxon	Espèces type	Références
Classe- <i>Actinobacteria</i>		
Ordre - <i>Bifidobacteriales</i>		
Famille - <i>Bifidobacteriaceae</i>		(Zhi et al., 2009)
Genre- <i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>	(Skerman, 1980), (Orla-Jensen, 1924)
Genre- <i>Aeriscardovia</i>	<i>A.aeriphila</i>	(Simpson et al., 2004)
Genre- <i>Alloiscardovia</i>	<i>A.omnicolens</i>	(Huys et al., 2007)
Genre- <i>Metiscardovia</i>	<i>M.criceti</i>	(Okamoto et al., 2007)
Genre- <i>Pariscardovia</i>	<i>P.denticolens</i>	(Jian & Dong, 2002)
Genre- <i>Scardovia</i>	<i>S.inopinata</i>	(Jian & Dong, 2002)
Genre- <i>Gardnerella</i>	<i>G.vaginalis</i>	(Greenwood, 1983)

Tableau 1 : Taxonomie de la famille des *Bifidobacteriaceae* (Mattarelli et al., 2014).

Aujourd'hui, le genre *Bifidobacterium* est classé dans la classe des *Actinobacteria*, sous-classe des *Actinobacteridae*, ordre des *Bifidobacteriales*, famille des *Bifidobacteriaceae* (Mattarelli et al., 2014) (Tableau 1). Les autres genres appartenant à la famille des *Bifidobacteriaceae* sont : *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bombiscardovia*, *Gardnerella*, *Metiscardovia*, *Pariscardovia*, *Pseudocardovia*, et *Scardovia* (Tableau 1) (Huys et al., 2007; Jian & Dong, 2002; Mattarelli et al., 2014).

La taille des chromosomes varie entre 1,94 (*B.animalis subsp. lactis DSM 10140*) et 2,8 Mbp (*B.longum subsp. infantis ATCC 15697*) comprenant entre 1500 et 2500 ORFs. Ainsi, le chromosome de *B.longum DJO10A* contient 2.375.792 pb, avec une teneur en G+C de 60,15% et 1 990 gènes (Lee et al., 2008). En outre, l'alignement de huit génomes complets de *B.breve*, en utilisant la souche *B.breve* UCC2003 comme référence, établit une longueur de

séquence moyenne de 2323100 pb, où *B.breve* JCM 7017 représente la souche avec le plus petit chromosome (avec une taille de 2288919 pb), tandis que *B. breve* UCC2003 possède le plus grand chromosome (avec une taille de 2422684) (Bottacini et al., 2014).

La culture de ces souches dans des milieux synthétiques pendant plusieurs générations pour les besoins de l'industrie du probiotique pourrait être à l'origine de la réduction de la taille génomique par la perte de matériel génétique non indispensable par rapport à leurs niches écologiques naturelles.

1.1.1.3 Espèces

La classification des espèces *Bifidobacterium* répond à la recommandation 30b du Code de Bactériologie, à savoir une caractérisation phénotypique, génotypique et écologique assurant une spécification polyphasique (Mattarelli et al., 2014). Au cours des 20 dernières années, les avancées en termes de séquençage et d'analyse génomique ont engendré une constante évolution de la taxonomie au sein du genre *Bifidobacterium* (Matsuki et al., 1999; Ventura et al., 2005b; Zomer et al., 2009). Sur la base de leurs niches écologiques et l'analyse comparative de leurs ARNS 16S, le nombre d'espèces rattaché au genre *Bifidobacterium* ne cesse de croître et comprend désormais plus de 40 espèces (Fig.1). Le nombre n'est pas définitif, certaines espèces n'étant pas validées par le sous-comité *Lactobacillus/Bifidobacterium* (Mattarelli et al., 2014). Ainsi, l'espèce *B.stercoris* proposée en 2010 a été réintégrée dans l'espèce *B.adolescentis* en 2013 (Killer et al., 2013). De même, le continuum *B.longum-infantis-suis* après une première séparation a été réuni en une seule espèce, *B.longum* en 2002 (Sakata et al., 2002). En 2014, la note taxonomique du sous-comité fait état de 42 espèces (Mattarelli et al., 2014).

Ces différentes espèces peuvent être regroupées en six groupes phylogénétiques différents: *B.asteroides*, *B.pseudolongum* ; *B.adolescentis* ; *B.longum* ; *B.boum* et *B.pullorum* (Ventura

et al., 2006a). Parmi ces espèces, *B.asteroides* est prédit comme étant l'espèce candidate la plus étroitement liée à l'espèce ancestrale ayant donné lieu au genre *Bifidobacterium* (Ventura et al., 2006a). Cette proposition phylogénétique sur la base d'un seul gène s'oppose aux habitudes taxonomiques qui attribuaient la position d'espèce type (et de facto de genre) à la première souche décrite, à savoir dans le cas des bifidobactéries, *Bifidobacterium bifidum*. Toutefois, cette taxonomie n'est pas figée. Ainsi le gène codant pour l'ARN 16s est trop peu variable dans ses séquences pour permettre une différenciation satisfaisante des espèces de bifidobactéries. Miyake et al montrent en 1998 que les espèces du genre *Bifidobacterium* présentent plus de 93% d'identité de leurs séquences d'ADNr 16S (Miyake et al., 1998). Le gène codant pour l'HSP60 est proposé comme critère discriminant alternatif, quand il est analysé par la technique de PCR-RFLP (Baffoni et al., 2013). D'autres gènes de ménage (*atpD*, *dnaK*, *groEL*, *recA*, *tal*, *tuf*, *xfp*) ont été étudiés et sont plus discriminants que le gène de l'ARNr16S (Junick & Blaut, 2012; Ventura et al., 2006a; Ventura et al., 2004; Ventura & Zink, 2003). Malheureusement seul un nombre limité de séquences de ces gènes sont disponibles dans les banques de données internationales.

Cependant le développement de nouvelles approches génomiques (phylogénomiques) sont en train de révolutionner la classification des bifidobactéries. Ce nouvel outil pointe des incohérences dans la taxonomie actuelle de bifidobactéries. A ce jour, parmi les 42 espèces du genre *Bifidobacterium*, seules dix ont été entièrement séquencées (GOLD-Genome Online Database).

Mais il apparaît déjà nécessaire de redéfinir la taxonomie du genre *Bifidobacterium*. Lugli et al. proposent ainsi le regroupement d'espèces réduisant à 34 espèces les 39 retenues par les auteurs (Lugli et al., 2014). En outre, 7 groupes phylogénétiques sont proposés au lieu des six précédents, avec l'ajout du groupe incluant *B.bifidum* (Fig.1).

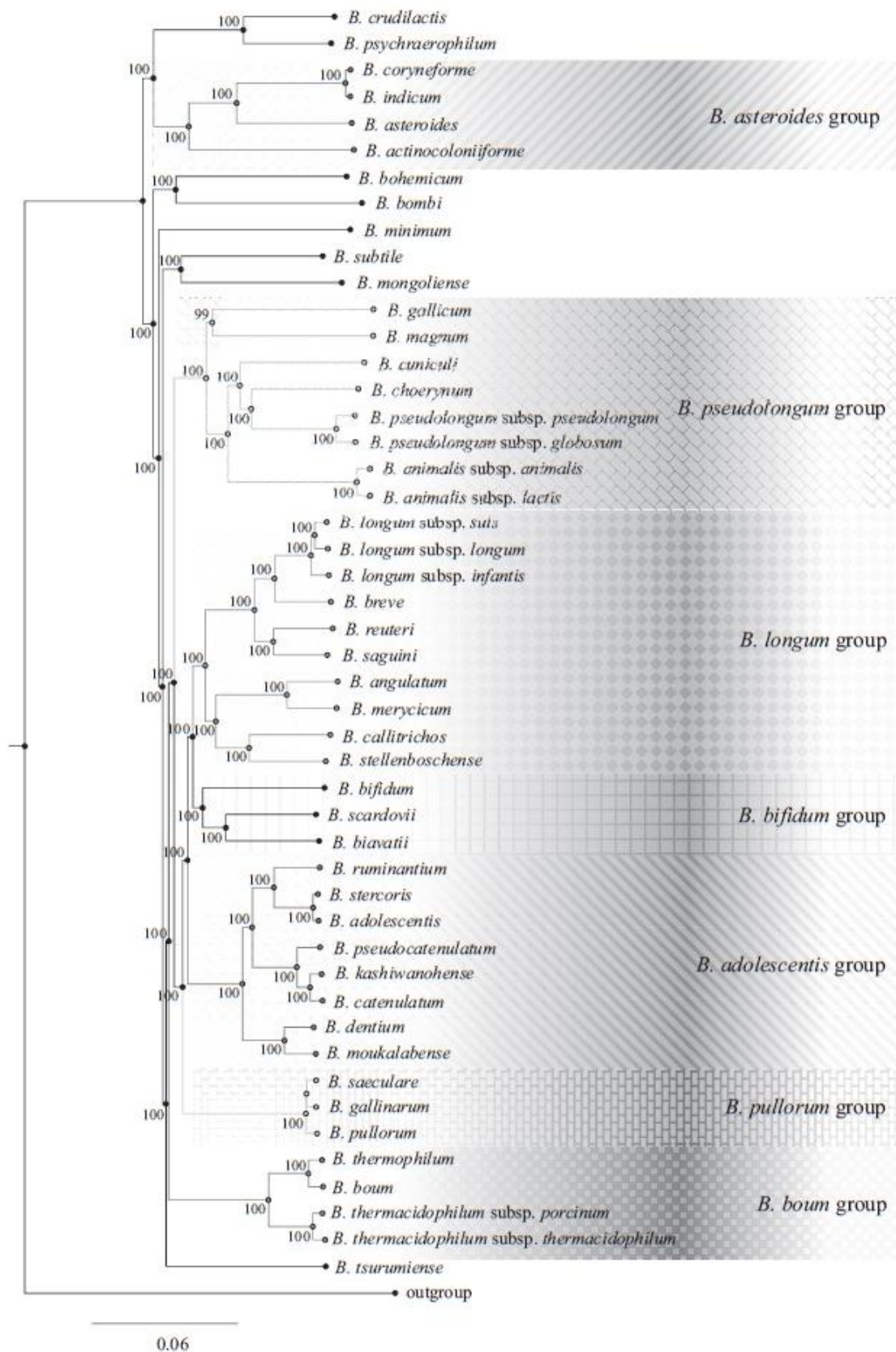


Fig. 1 : Arbre phylogénétique du genre *Bifidobacterium* basé sur la comparaison des séquences d'acides aminés BifCOG. Les sept groupes phylogénétiques sont mis en évidence par des motifs hachurés. Adaptée de (Lugli et al., 2014).

1.1.2. Composition de la paroi des bifidobactéries

La paroi bactérienne est une barrière physique fonctionnelle située entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Elle permet la communication entre la cellule bactérienne et son environnement. Cette structure est capable de contenir la pression osmotique intracellulaire, d'adapter les bactéries à l'environnement et de les protéger contre les agressions. La paroi des bifidobactéries est caractéristique des bactéries Gram +. Elle est constituée d'une couche de peptidoglycanes contenant des protéines, des polysaccharides et des acides téchoïques.

1.1.2.1 Peptidoglycane

Le peptidoglycane est un constituant majeur de la paroi des bactéries Gram +. Il est constitué d'un polymère de glycosaminopeptide. Chez *B.bifidum*, sa structure se compose de la chaîne oligosaccharidique alternant N-acétyl-D-glucosamine (NAG) et d'acide muramique (NAM), et de chaîne tétrapeptidiques. La composition et le type de liaison des tétrapeptides du peptidoglycane peuvent varier entre les espèces, et entre les souches et peuvent être utilisés comme critère de différenciation (Lauer & Kandler, 1976). Ainsi, chez *B.bifidum*, ces chaînes comprennent les acides aminés suivants : ornithine, aspartate, glutamate, alanine, et de sérine avec un rapport de 1: 1: 1: 1: 3: 2: 1 (Veerkamp, 1971). Les espèces *B.breve*, *B.infantis*, *B.asteroides* partagent le même motif tétrapeptidique composé de L -Lys-Gly alors que le motif complexe (L -Orn- L -Ser- L -Ala- L -Thr- L -Ala) est plus spécifique de *B.longum* (Schleifer & Kandler, 1972).

1.1.2.2 Acide lipoteichoïque

La plupart des bactéries Gram+ possèdent également des acides lipoteichoïques composés de chaînes de polyglycerophosphate et de glycolipides. L'acide lipoteichoïque est ancré à la

membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un diacylglycérol. Il intervient dans la régulation des enzymes autolytiques (muramidase) de la paroi autolytique. Ces structures amphiphiles isolées à partir de cinq souches de *Bifidobacterium* issues de 3 espèces différentes (*B.longum*, *B.breve*, *B.bifidum*) ont des longueurs de chaînes de glucane et de β -galactomannane différentes. Le nombre de branchements de glycérophosphate varie également entre les espèces (Iwasaki et al., 1990).

Ces structures lipophiles interagissent avec l'hôte. L'acide lipotéchoïque isolé de *B.bifidum* ralentit le vieillissement induit par injection chronique de D-galactose dans un modèle murin (Yi et al., 2009). Par ailleurs, l'activité anti-oxydante intracérébrale est améliorée *in vitro* et est associée à l'augmentation d'IL-2 et la diminution du TNF-alpha *in vivo*. L'effet anti-tumoral des acides lipotéchoïques d'une souche de *Bifidobacterium* a été également exploré (Wang et al., 2007). Les LTA de *Bifidobacterium* entraînent d'une part la diminution d'expression de la survivine dans les cellules LoVo en inhibant l'activité de la voie de transduction PI3K / AKT, et d'autre part l'augmentation d'expression de p53. En outre, on observe une augmentation de l'activité des caspases se traduisant par l'apoptose des cellules LoVo.

1.1.2.3 Protéines de la paroi

La paroi est également composée de protéines capables d'interagir avec l'hôte. Dans l'intestin les protéines de surfaces constituent le premier point de contact avec les cellules de l'hôte. Elles jouent un rôle central dans l'adaptation et la colonisation de la bactérie à l'environnement gastro-intestinal et pour l'induction d'une réponse de l'hôte (Marco et al., 2006).

- Adhésines

Des composés protéiques de surfaces sont impliqués dans l'adhérence des bifidobactéries aux cellules intestinales via la liaison avec glycolipides intestinaux (Mukai et al., 2004).

Il a été démontré *in vitro* que l'adhérence des bifidobactéries aux cellules épithéliales intestinales humaines est souche-dépendante et pH-dépendante (Riedel et al., 2006). Les conditions d'adhésion des bifidobactéries sont améliorées si elles sont capables d'auto-agrégation et si elles présentent un degré d'hydrophobicité élevé (Del Re et al., 2000). Par ailleurs, l'adhérence des souches de *B.longum* NCC 2705 et *BIF* 53 à la mucine est réduite par un traitement avec du lysozyme, ce qui suggère l'implication d'un composant de la paroi cellulaire (Izquierdo et al., 2008).

Une lipoprotéine de surface nommée BopA participe à l'adhésion de la souche *B.bifidum* MIMBb75 sur une lignée cellulaire intestinale humaine (Gleinser et al., 2012; Guglielmetti et al., 2009). Néanmoins, l'adhésion de la souche aux cellules Caco-2 et HT-29 dépend des conditions environnementales. L'adhésion est favorisée en présence de mannose et de fucose et en l'absence de sels biliaires de boeuf. Le pH joue également un rôle dans l'auto-agrégation bactérienne. Le gène de *bopA* fait partie d'un opéron codant pour un transporteur ABC et la protéine contient un domaine transporteur ABC suggérant une bi-fonctionnalité de cette protéine (absorption de nutriments et adhésion) (Gleinser et al., 2012). Par ailleurs, le séquençage complet du génome de *B.bifidum* S17 a mis en évidence au moins 10 gènes qui codent pour des adhésines potentielles et la plupart ont une expression plus élevée pendant la phase exponentielle de croissance (Zhurina et al., 2011). L'augmentation de l'expression de ces adhésines est associée à l'augmentation de l'adhésion de la souche aux cellules Caco-2.

- Pili

D'autres structures peuvent participer au processus d'adhésion comme les pili (ou fimbriae). Ce sont des appendices trouvés fréquemment dans diverses bactéries à Gram négatif et Gram positifs. Chez les bactéries Gram+, les pili sont issus de la polymérisation covalente de sous-unités de piline, réalisée par des enzymes appelées transpeptidase sortases. Tous les génomes de *Bifidobacterium* séquencés jusqu'à présent possèdent des groupes de gènes codant pour des Tad et/ ou des sortases (O'Connell Motherway et al., 2011; Turrone et al., 2013). Foroni et al ont montré par microscopie à force atomique que des appendices ressemblant à des pili existent chez *B.longum subsp. longum*, *B.dentium*, *B.adolescentis*, *B.bifidum* et *B.animalis subsp.lactis* (Foroni et al., 2011). De plus, il a été démontré dans un modèle murin que la protéine Tad de *B.breve* UCC2003 est un facteur essentiel pour la colonisation de l'hôte (O'Connell Motherway et al., 2011). Par ailleurs, l'expression des séquences codantes des appendices de *B.bifidum* PRL2010 chez *Lactococcus lactis* (dépourvu de pili) améliore son adhésion aux entérocytes humains. En outre, on observe une augmentation de TNF- α chez les *L.lactis* présentant des pili par rapport aux bactéries dépourvues de pili ce qui suggère qu'outre le fait de participer à l'adhésion les pili présentent des propriétés immunomodulatrices (Turrone et al., 2013).

- Serpine

Chez *B.longum*, la serpine, protéine de surface, est capable d'inhiber les protéases de la famille des élastases *in vitro* (Ivanov et al., 2006). Elle est présente chez au moins 5 espèces du genre *Bifidobacterium*. Différentes protéases induisent la transcription du gène de la serpine chez différentes espèces de bifidobactéries (*B.longum*, *B.breve*, *B.dentium*) (Turrone et al., 2010b). La serpine des bifidobactéries peut être en contact avec des élastases de l'habitat naturel. La protection contre ces activités protéolytiques pourrait jouer un rôle

important dans l'homéostasie entre les bifidobactéries et leur hôte. En effet, suite à une infection bactérienne dans l'intestin, les protéases à sérine sont libérées au site inflammatoire (Reeves et al., 2002). L'hypothèse actuelle est que les serpins de *Bifidobacterium* provoquent une activité anti-inflammatoire par blocage des élastases.

- Autres protéines de la paroi

Certaines protéines de la paroi cellulaire favorisent la colonisation bactérienne de l'hôte. Ainsi, la paroi cellulaire de *B.animalis subsp. lactis* présente cinq protéines se fixant au plasminogène, dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire pour faciliter la colonisation de l'intestin (Candela et al., 2007). Par une approche protéomique, Wei et al. ont montré que certaines de ces protéines sont exprimées in vitro chez *B.longum* NCC2705 lorsqu'elles sont en co-culture avec des cellules épithéliales intestinales. Ceci indique que les bifidobactéries pourraient être capables de détecter la présence de cellules épithéliales de l'intestin et de réagir en exprimant des molécules adhésives capables d'interagir avec ces cellules (Wei et al., 2014). Plus récemment, Ruiz et al ont étudié le protéome de la paroi d'une souche de *B.longum* (Ruiz et al., 2009). Il ressort des prédictions bioinformatiques que 145 protéines possèdent un peptide signal, 361 sont membranaires, 13 protéines sont liées de manière covalente au peptidoglycane et 25 sont des lipoprotéines. Ils ont identifié 141 protéines dans la fraction de membrane composée majoritairement de transporteurs membranaires. A partir de la fraction soluble de l'enveloppe, 128 protéines ont été identifiées (représentant 10% du protéome total) dont les plus abondantes interviennent dans le processus de colonisation intestinale (la glutamine synthétase, le facteur d'élongation Tu, l'énolase) et dans catabolisme des glucides (phosphocétolase). Fait remarquable, la présence de bile augmente la concentration de certaines protéines, comme l'énolase et les transporteurs ABC. La résistance à la bile est importante pour la colonisation et la persistance des

microorganismes gastro-intestinaux. De plus, l'expression des transporteurs MDR (multi drug resistance) induite par la bile a été mise en évidence chez *B.longum* et *B.breve* reflétant leur rôle dans la résistance à la bile et leur implication éventuelle dans la colonisation intestinale (Gueimonde et al., 2009).

1.1.2.4 EPS

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de haut poids moléculaire qui sont composés de résidus de sucre et sont sécrétés dans le milieu environnant. Les gènes pour la production des EPS ont été identifiés dans la plupart des génomes des bifides mais leur structure génétique est très variable et faiblement conservée (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014b). La production d'EPS par *B.breve UCC2003* est importante pour la colonisation de l'hôte. Des mutants de cette souche incapable de produire des EPS résistent moins bien à des conditions acides et à la bile. De plus, la souche sauvage productrice d'EPS colonise plus efficacement l'intestin de souris et a un pouvoir immunogène plus important que les souches mutantes (Fanning et al., 2012). Cependant, même si le support génétique des EPS est présent dans la plupart des bifidobactéries, il reste à déterminer expérimentalement si tous les bifides sont capables de produire des EPS et d'évaluer leur capacité d'interaction avec l'hôte.

1.1.3 Physiologie

1.1.3.1 Métabolisme

Les génomes des *Bifidobacterium* codent pour un large arsenal d'enzymes impliqués dans le catabolisme des sucres. Plus de 50 carbo-hydrolases ont été identifiés chez les bifidobactéries ce qui confirme que ce genre est spécialisé dans le métabolisme des sucres (van den Broek et al., 2008). Chez *B.dentium Bd1*, 14% des protéines codent pour des protéines impliquées dans

le transport et le métabolisme des sucres ce qui représente le pourcentage le plus élevé chez les bifidobactéries. Ce taux pourrait s'expliquer par la disponibilité accrue des différentes sources d'énergie dans la cavité buccale (Ventura et al., 2009).

Les bifidobactéries sont les organismes saccharolytiques capables de fermenter le glucose, le galactose et le fructose par une voie qui leur est spécifique. Elles utilisent la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) ou encore appelée « shunt » du fructose 6-phosphate (Scardovi, 1965). La voie des pentoses phosphates complète le métabolisme des sucres pour produire de l'acétate et du lactate avec un ratio molaire 3/2 (Fig. 2). Cependant toutes les souches et espèces bifides ne sont pas égales devant la fermentation des glucides et alcools. Les bifidobactéries sont capables de métaboliser une large gamme d'hydrates de carbone comme les mucines, la pectine, les xylo-oligosaccharides (XOS) les fructo-oligosaccharides (FOS), les galacto-oligosaccharides (GOS) et les oligosaccharides du lait de femme (HMO) mais beaucoup de glycosyl-hydrolases ne sont pas encore identifiées (Cronin et al., 2011).

Connus depuis les années 30 sous le terme de gynolactose, les HMO stimulent la croissance des bifidobactéries (Polonovski, 1933). Toutes les espèces *Bifidobacterium* n'ont pas les mêmes capacités de croissance vis-à-vis des HMO. L'espèce type *B.bifidum*, en particulier le variant b, prolifère en milieu minimum supplémenté par les oligosaccharides (Gyorgy & Rose, 1955). Pour ce faire, *B.bifidum* sécrète les enzymes nécessaires contrairement à l'espèce *B.longum* qui doit internaliser les substrats (Zhao & Cheung, 2013). Parmi les trois sous-espèces de *B.longum*, espèce prédominante du microbiote intestinale des nourrissons nourris au sein, seul *B.longum subsp. infantis* a des capacités de croissance élevées avec les HMO (Locascio et al., 2009). LoCascio et al. ont émis l'hypothèse que la stratégie métabolique adoptée par cette sous-espèce pendant sa co-évolution avec les composants du lait, vise à tirer un avantage compétitif pour la colonisation bactérienne de l'intestin.

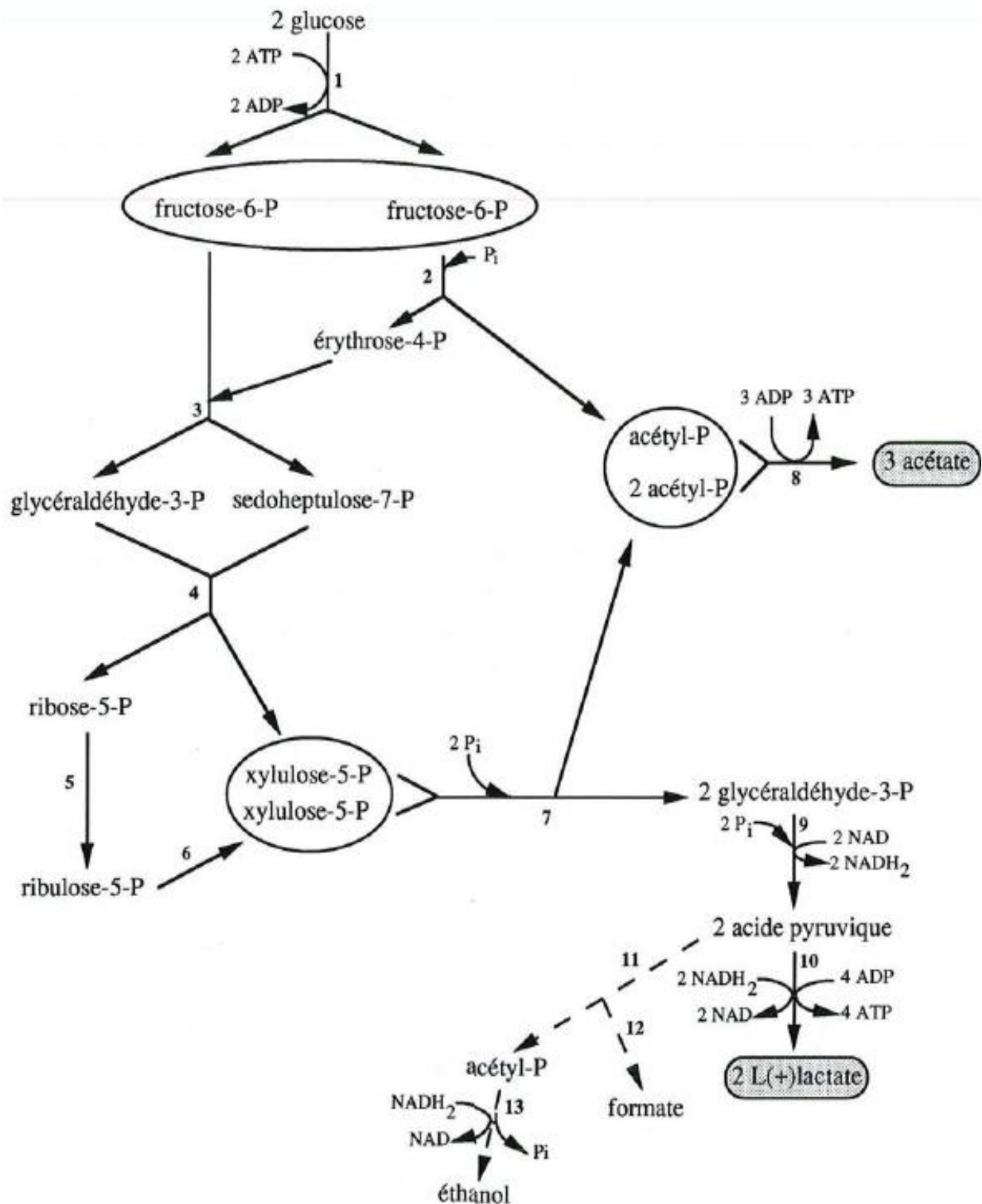


Fig. 2 : Dégradation des hexoses par la voie du fructose 6-phosphate phosphocétolase .1 : hexokinase et glucose-6-phosphate isomérase ;2 : fructose-6-phosphate phosphocétolase ; 3 : transaldolase ; 4 : transcétolase ; 5 : ribose-5-phosphate isomérase ; 6: ribulose-5-phosphate 3-épimérase ; 7 : xylulose-5-phosphate phosphocétolase; 8 : acétate kinase; 9 : enzymes de la voie homofermentaire; 10 : L(+) lactate déshydrogénase; 11 : enzyme phosphoroclastique ; 12 : formate déshydrogénase ; 13 : alcool déshydrogénase. D'après (Scardovi, 1965).

L'analyse du génome de *B.longum subsp.infantis* ATCC 15697 a permis d'identifier des régions susceptibles d'être impliquées dans le métabolisme des HMO (Sela et al., 2008). Des études comparatives ont mis en évidence que des éléments génétiques du métabolisme des HMO sont conservés dans le génome de souche de *B. longum subsp. infantis* de phénotype HMO+ alors qu'ils ont divergé chez les souches de *B. longum subsp. longum* de phénotype HMO-. Ces éléments codent pour la fucosidase, des sialidases, des glycosyl hydrolases, des transporteurs ABC, et les SBPs. Il ressort de ces études que l'espèce *B.longum* comporte au moins deux sous-espèces distinctes: *B.longum subsp.infantis*, adapté pour utiliser les hydrates de carbone du lait dans le tractus gastro-intestinal infantile, et *B.longum subsp.longum*, spécialisé dans le métabolisme des hydrates de carbone d'origine végétale associé au tractus-gastro intestinal adulte (LoCascio et al., 2010; Sela et al., 2008).

1.1.3.2 Facteurs physiques et chimiques modulant la physiologie bifide

- Température

Les espèces d'origine humaine ont une croissance optimale à des températures comprises entre 36°C et 38°C, celles d'origines animales poussent à des températures plus élevées (41–43°C) excepté pour l'espèce *B.thermacidophilum* qui peut croître à une température de 49,5°C (Dong et al., 2000; Gavini et al., 1991). Il n'y a généralement pas de croissance en dessous de 20 °C à l'exception de l'espèce *B.psychroaerophilum*, qui se développe à 8 °C (Biavati et al., 1992; Simpson et al., 2004). Certaines bifidobactéries mettent en œuvre des mécanismes moléculaires face au stress engendré par des conditions de température défavorables. Plusieurs gènes ont été identifiés (*groESL*, *dnaK*, *clpB*, *CLPC*, *adn J2* et *clpP*) dont l'expression est induite en condition de stress, et en particulier lors d'un choc thermique (Ventura et al., 2006b). Les « heat shock protein » (HSP) sont également importantes pour

établir une réponse appropriée au stress thermique. Elles permettent de prévenir la dénaturation irréversible de protéines endommagées par la chaleur. L'analyse du génome de *Bifidobacterium breve* UCC2003 a révélé un seul gène codant pour une HSP, le gène *hsp20*. Ce gène est peu représenté dans les autres espèces du genre *Bifidobacterium* puisqu'il est présent uniquement chez 7 espèces (Ventura et al., 2007b).

- pH

Le pH optimal de croissance des bifidobactéries est compris entre 6 et 7 même si certaines souches sont capables de survivre à un pH beaucoup plus acide. Ainsi, *B.animalis subsp. animalis lactis* et d'autres souches survivent à un pH compris entre 3 et 5. Les souches tolérantes présentent une activité ATPase supérieure aux souches acidosensibles (Matsumoto et al., 2004) L'ATPase, pompe à protons, joue un rôle déterminant dans la survie des bifidobactéries dans des environnements acides. Fait intéressant pour l'exploitation en industrie laitière, certaines souches de bifidobactéries sont capables de s'adapter au stress acide. Récemment, il a été montré que la réponse de tolérance acide des cellules, provoquée par un stress acide à un pH sub-létal, pouvait améliorer la résistance à l'acide des bifidobactéries soumis ultérieurement à ce même stress (Jin et al., 2015). On note également que chez les cellules pré-stressées, la quantité de protéines impliquées dans la production d'énergie, la synthèse de la muréine et le métabolisme des acides aminés est augmentée pendant le stress acide. Après stress acide, on observe une augmentation significative de la teneur en ATP, en NH₃, en thiols, du peptidoglycane et de l'activité de la pompe à proton ATPase ainsi que le maintien du pH intracellulaire chez les cellules pré-stressées par rapport aux cellules non induites (Jin et al., 2015).

- Aérotolérance

Les bifidobactéries bien que classées parmi les anaérobies, peuvent parfois tolérer l'oxygène. Certaines souches sont partiellement aéro-tolérantes en présence d'agent réducteur en milieu liquide (Kheadr et al., 2007). Les espèces *B.longum*, *B.breve*, et *B.infantis* présentent une croissance marquée dans des conditions d'aération partielle alors que ce n'est pas le cas pour *B.adolescentis* (Shimamura et al., 1992). L'analyse du génome de *B.longum* suggère que la croissance et la survie sous atmosphère oxygénée sont liées à la présence d'enzymes appelées NADH-oxydase (Schell et al., 2002). Chez les espèces sensibles à l'oxygène comme *B.adolescentis*, on observe une réduction de 10 à 20 % de l'activité des NAD-oxydases et des NAD-peroxydases par rapport aux espèces tolérantes comme *B.breve*, *B.longum* ou *B.infantis* (Cronin et al., 2011).

1.1.3.3 Facteurs génétiques pouvant moduler la physiologie bifide

- Plasmides

L'information génétique des *Bifidobacterium* contrôlant les activités métaboliques est portée par un unique chromosome circulaire. Néanmoins, on retrouve chez certaines souches (principalement *B.longum*) la présence d'un ou plusieurs plasmides. Les plasmides sont des éléments génétiques qui se répliquent de manière autonome à partir du chromosome en utilisant la machinerie répliquative de la cellule. Ils apportent de nouvelles fonctionnalités aux cellules comme l'utilisation de substrat complexe, des résistances à des antibiotiques ou à des phages et des facteurs de virulence (Mills et al., 2006; O'Driscoll et al., 2006).

L'équipe de Sgorbati et al. fut la première à identifier la présence de plasmides chez les bifidobactéries (Sgorbati et al., 1982). Dans cette étude, les plasmides ont été identifiés dans environ 20% des souches de quatre espèces différentes (*B.longum*, *B.globosum*, *B.asteroides*

et *B.indicum*). A l'heure actuelle une trentaine de plasmides ont été isolés et séquencés à partir de souches de *B.longum* (16 plasmides), *B.breve* (3 plasmides), *B.asteroides* (2 plasmides) et *B.bifidum* (2 plasmides) et *B.pseudocatenulatum* (1plasmide), *B.catenulatum* (1 plasmide), *B.globosum* (1 plasmide) et *B.indicum* (1 plasmide) (Alvarez-Martin et al., 2007; Mattarelli et al., 1994; Sgorbati et al., 1982). Leur taille varie de 1,8kb à 10,2kb et les souches porteuses contiennent un plasmide unique excepté pour quelques souches de *B.longum* qui peuvent en compter deux ou trois. La plupart des plasmides de *Bifidobacterium* étudiés aurait un mode réplcatif de type cercle roulant, à l'exception de six plasmides qui possèdent le matériel génétique pour une réplcation de type « thêta ». Hormis leur mode de réplcation, leur biologie et leur fonction restent aujourd'hui peu connues. Le séquençage complet du génome du plasmide pBIF10 isolé de la souche de *Bifidobacterium longum* B200304 a mis en évidence la présence du gène de résistance à la tétracycline (Ma et al., 2015).

- Phage

En 1966, l'équipe de Youssef et al. fut la première à rapporter la présence de phage spécifique de *Bifidobacterium* (Youssef et al., 1966). En 1971, Matteuzzi et Sozzi observe au microscope électronique un phage lytique chez *B.ruminale* (Matteuzzi & Sozzi, 1971). Les avancées en matière de séquençage des génomes ont permis d'augmenter sensiblement les informations relatives aux phages. Des éléments génétiques prophagiques ont été retrouvés dans le génome de 22 souches issues d'espèces de *Bifidobacterium* différentes, mais très peu d'informations sur leur fonctionnalité ont été décrites (Ventura et al., 2010). Les prophages de *Bifidobacterium* possèdent une organisation génomique modulaire classique dans lequel le module de lysogénie de l'ADN et la région d'encapsidation de l'ADN sont les mieux conservés (Alegria et al., 2014). Ainsi, trois éléments prophagiques sont présents dans le génome de *B.breve* UCC2003, *B.longum* biotype *longum* et *B.longum* CC2705 biotype

longum DJO10A (Ventura et al., 2005a). Ces éléments génétiques sont homologues en terme de séquence et de structure avec ceux des bactériophages infectant les bactéries Gram+ ce qui suggère une évolution commune. D'autres gènes prophagiques ont été retrouvés dans les génomes de *B.longum subsp. infantis* ATCC15697 et *B.animalis subsp.lactis* DSM10140 et Bl-04 (Barrangou et al., 2009; Sela et al., 2008). Plus récemment, Alegria et al ont rapporté la présence d'un phage d'environ 43,5 kb intégré dans le génome de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* IPLA 36007(Alegria et al., 2014).

1.1.4 Ecologie

1.1.4.1 Niches écologiques

Les bifidobactéries ont été isolés à partir de six niches écologiques. Trois sont directement liées à la cavité orale et à l'environnement intestinal humain et animal (bovins, lapins, souris, poulet et insectes), tandis que d'autres niches (eaux usées, sang et alimentation) sont probablement la conséquence d'une contamination par le tractus gastro-intestinal (Ventura, 2015). On distingue des souches dites « humaines » (comme *B.longum*, *B.breve*, *B.bifidum*, *B.adolescentis*, *B.pseudocatenulatum*...) et d'autres dites « animales » (comme *B.pseudolongum*, *B.thermophilum*, *B.animalis*...) (Fig. 3). Par contre, le portage de souches « humaines » chez les animaux n'est pas inhabituel (Lamendella et al., 2008). Ainsi les espèces *B.bifidum*, *B.adolescentis*, ont été détectées respectivement chez 7 et 8 hôtes différents (Lamendella et al., 2008). A l'inverse, trois espèces (*B. coryneforme*, *B. indicum*, *B.asteroides*) sont retrouvées exclusivement chez l'insecte. Les espèces *B.cuniculi*, *B. angulatum* et *B. gallinarum* présentent une adaptation écologique stricte à l'intestin animal alors que d'autres espèces (*B.animalis*, *B.adolescentis*, *B.dentium* et *B. catenulatum*) sont écologiquement plus cosmopolites (Lamendella et al., 2008; Ventura et al., 2007a).

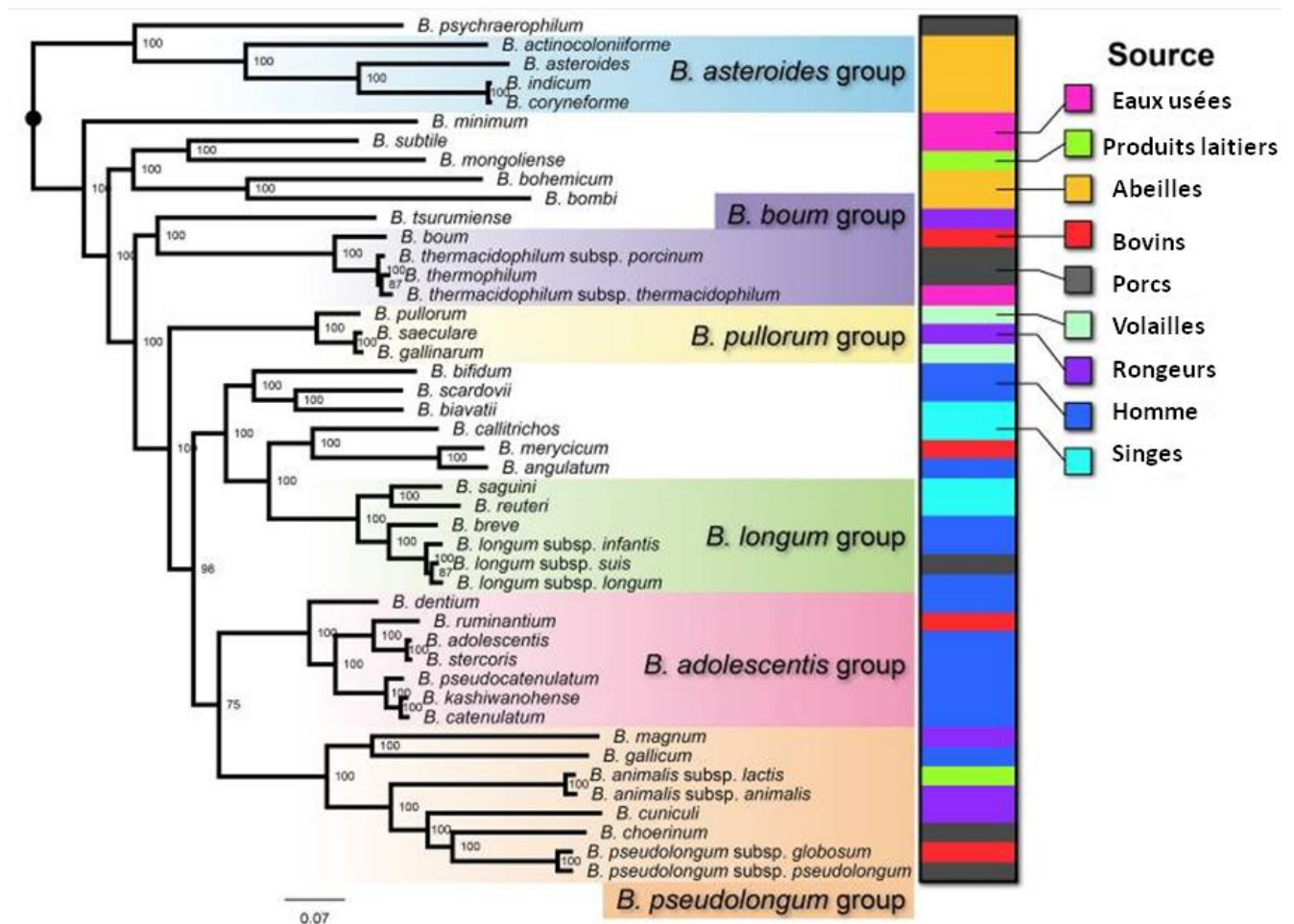


Fig. 3 : Arbre phylogénétique et niches écologiques principales de 45 espèces de *Bifidobacterium*. Adaptée de (Sun et al., 2015).

1.1.4.2 Colonisation intestinale

Les recherches utilisant les méthodes de culture effectuées durant le 20ème siècle ont conduit à un schéma « classique » de colonisation intestinale chez le nouveau né encore largement accepté. Après la naissance, les bactéries anaérobies facultatives, principalement des staphylocoques, *Streptococcus*, entérocoques et entérobactéries, sont les pionnières et s'établissent en nombre élevé dans les premiers jours de vie. L'installation de ces colonisateurs primaires change les conditions environnementales (diminution de l'aérobiose, du potentiel d'oxydo-réduction et modification du pH) (Wilson, 2008), permettant l'installation secondaire des bactéries anaérobies strictes en population dominante. Les

bifidobactéries sont parmi les premières bactéries anaérobies capables d'atteindre des niveaux élevés chez la plupart des nouveau-nés entre la première et la deuxième semaine de vie (Bezirtzoglou & Romond, 1990).

Aujourd'hui, de nouvelles méthodes moléculaires telles que le séquençage à haut débit, les quantifications par PCR ou par technique FISH, sont utilisées pour compléter ces données (Bezirtzoglou et al., 2006; Jost et al., 2012). Une étude de cohorte indienne sur 83 enfants, confirme l'établissement d'une flore composée majoritairement de bifides à partir du 7^{ème} jour après la naissance (Kabeerdoss et al., 2013). Turroni et al. observent également une colonisation fécale importante par des *Bifidobacteriales* (80,6%) chez des nouveau-nés d'origine géographique variée (Turroni et al., 2012). Chez ces enfants, les espèces dominantes du genre *Bifidobacterium* sont *B.longum* et *B.bifidum* représentant respectivement 56,2% et 10,7% des bifidobactéries totales alors que chez les mamans, ce sont les espèces *B.longum* (38,2%) et *B.adolescentis* (20,3%) qui prédominent. Ces résultats corroborent les analyses génomiques mettant en évidence l'adaptation génétique des espèces *B.longum subsp.infantis* et *B.bifidum* pour l'utilisation des glycanes produits par l'hôte comme la mucine ou les oligosaccharides du lait maternel (Ruas-Madiedo et al., 2008; Sela et al., 2008; Turroni et al., 2010a). En effet, des enzymes capables de dégrader ces glycanes complexes tels des fucosidases, des sialidases, des β -hexosaminidases et des β -galactosidase ont été identifiés chez ces deux espèces (Ashida et al., 2009; Kiyohara et al., 2011; Sela et al., 2008). Par exemple, la lacto-N-biosidase identifiée chez *B.bifidum* libère des lacto-N-biose I (Gal β 1,3GlcNAc) à partir de lacto-N-tétraose (Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc) composant majeur des oligosaccharides du lait maternel (Wada et al., 2008). Les hydrates de carbone générés peuvent être de nouveau dégradés par d'autres enzymes extracellulaires, comme les β -galactosidases et les β -N-acétylhexosaminidases. Toutefois, d'autres bactéries intestinales humaines (*Bacteroides spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Clostridium spp.* et *Akkermansia*

muciniphila) ont également la capacité de dégrader des sucres complexes comme la mucine et sont en compétition avec les bifidobactéries (Collado et al., 2007; Wada et al., 2008). Par ailleurs, une étude sur 7 enfants nourris au sein a montré qu'outre le fait que les bifidobactéries soient présentes dès la première semaine après la naissance, les *Bacteroides* sont retrouvés de manière inattendue à un taux aussi important (Jost et al., 2012). Habituellement corrélés inversement au taux de bifidobactéries, des taux élevés de *Bacteroides* sont rares au cours de la période néonatale, même si le moment de leur apparition n'est pas bien défini et varie d'un individu à l'autre (O'Connell Motherway et al., 2011).

Cette évolution pourrait avoir des répercussions importantes pour l'hôte. Vael et al. ont mis en évidence que la colonisation précoce de *Bacteroides fragilis* est associée à un risque plus élevé de développer de l'asthme (Vael et al., 2008). La capacité des *Bacteroides* à passer du milieu intestinal vers les organes extra-intestinaux (translocation bactérienne) et à favoriser la dissémination bactérienne pourrait également avoir des répercussions sur la santé de l'hôte (Romond et al., 2008).

D'autre part, des études métagénomiques confirment les travaux obtenus par culture montrant que l'abondance relative des bifidobactéries dans l'intestin diminue avec l'âge et que les espèces couramment identifiées sont *B.adolescentis* et *B.catenulatum* suivi par *B.longum* et *B.bifidum* (Biagi et al., 2010; Drasar, 1974; Eckburg et al., 2005; Mueller et al., 2006).

1.2 Prévention du diabète de type 1

1.2.1 Epidémiologie et symptomatologie

Le diabète est une maladie métabolique ayant pour principal effet une hyperglycémie. Cette élévation anormale du taux de glucose sanguin est liée à l'insuline, une hormone produite par

les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Le diabète est également l'une des principales causes de cécité, d'amputation et d'insuffisance rénale. En France, comme dans de nombreux pays, la prévalence du diabète ne cesse d'augmenter. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de diabétiques est passé de 135 millions en 1995 à 356 millions aujourd'hui. Il pourrait devenir la 7ème cause de décès dans le monde d'ici 2030.

Le diabète de type 1 (DT1) ou diabète insulino-dépendant est une maladie auto-immune dans 90% des cas et représente 10 à 15 % des cas de diabète. Elle se traduit par l'attaque lente et progressive des cellules β pancréatiques par le système immunitaire conduisant à la perte complète de sécrétion d'insuline. Parmi les principaux symptômes de cette maladie chronique, on peut citer une polyurie, une perte de poids, une polydipsie, une altération de la vision et une sensation de faim et de fatigue constante. Il survient souvent brutalement au cours de l'enfance ou de l'adolescence chez des individus prédisposés génétiquement. L'existence d'un terrain génétique favorable au développement du DT1 a fait l'objet de nombreuses recherches au cours des 40 dernières années.

1.2.2 Facteurs étiologiques

1.2.2.1 Prédisposition génétique

Les facteurs génétiques de prédisposition au DT1 sont attribués principalement à 2 régions génomiques. La première située dans région p21 du chromosome 6 comprenant les gènes HLA de classe 2 (= antigènes des leucocytes humains) (*DRB1*, *DQA1* et *DQB1*) contribue à environ 40-50% du risque de prédisposition génétique totale (Steck & Rewers, 2011). La seconde (10% du risque de prédisposition) est associée à la région promotrice du gène de l'insuline (Noble & Erlich, 2012). Cependant, l'incidence du DT1 ne cessant de croître dans

les pays industrialisés depuis 50 ans, les facteurs génétiques ne peuvent expliquer à eux seuls le développement du DT1. De plus, les taux de concordance pour le DT1 chez les jumeaux monozygotes est inférieur à 50% (Hyttinen et al., 2003). Ensuite, les études épidémiologiques du DT1 lors de migrations humaines montrent que l'incidence du diabète chez les descendants de personnes ayant migré d'un pays de faible incidence de DT1 vers un pays de forte incidence, est supérieure à celle enregistrée dans le pays d'origine (Bodansky et al., 1992; Hjern et al., 2012). Les facteurs de génétiques de prédisposition ne suffisant pas à expliquer ces phénomènes, il est nécessaire d'analyser l'influence de facteurs environnementaux. Deux hypothèses majeures sont explorées actuellement: la présence de virus diabétogènes dans l'environnement et une éducation imparfaite du système immunitaire du nourrisson liée à une hygiène inadaptée, au mode d'accouchement, à l'alimentation, facteurs qui conditionnent le microbiote (Fig. 4).

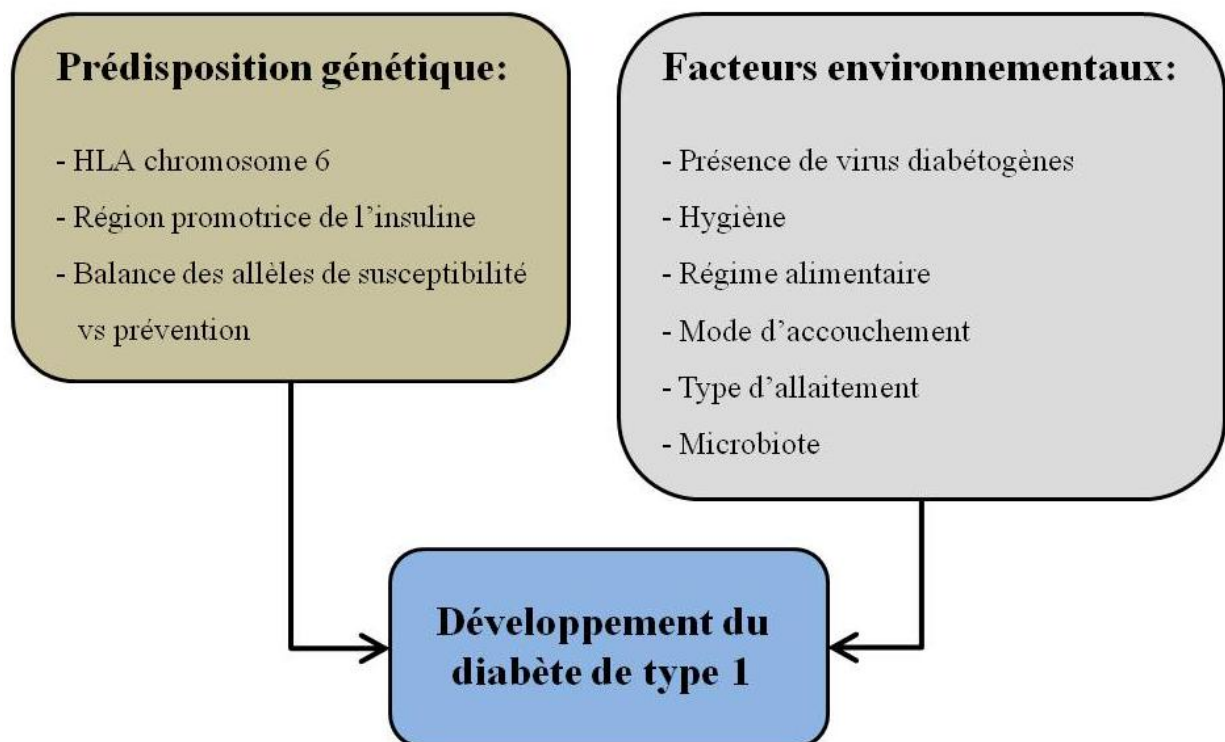


Fig. 4 : Facteurs étiologiques du diabète de type 1.

1.2.2.2 Virus diabétogènes

Les variations géographiques et saisonnières de l'incidence du DT1 ont orienté les chercheurs vers une étiologie virale du DT1 (Bach, 2002; Kalliora et al., 2011; Samuelsson et al., 2007). Du fait de leur tropisme pour les cellules beta pancréatiques, certains virus (coxsackie B, rubéole, cytomégalovirus...) sont associés au DT1 et pourraient initier ou amplifier une réaction auto-immune (Gamble et al., 1969; Pak et al., 1988). Les entérovirus sont les premiers candidats étiologiques du DT1. Ainsi, les anticorps anti-entérovirus se trouvent plus fréquemment chez les patients diabétiques récemment diagnostiqués que chez les témoins sains (Maha et al., 2003; Nairn et al., 1999). Les entérovirus les plus fréquemment mis en cause dans la littérature sont les coxsackies CV-B, et en particulier le CV-B4 (Alidjinou et al., 2014; Chehadeh et al., 2000b; Nairn et al., 1999). La détection de leurs ARN dans des échantillons de pancréas de patients diabétiques mais non dans ceux des sujets témoins constitue un élément de preuve de leur implication dans la pathologie du DT1 (Dotta et al., 2007; Ylipaasto et al., 2004). Par ailleurs, certaines souches de coxsackie virus (CV-B4 E2, CV-B4 VD2921...) peuvent infecter et endommager les cellules beta pancréatiques humaines (Chehadeh et al., 2000a; Frisk & Diderholm, 2000). *In vivo*, la souche CV-B4 E2 est capable d'infecter les îlots pancréatiques et d'induire une réaction auto-immune contre les cellules beta chez des souris CD-1 (See & Tilles, 1995).

Divers mécanismes ont été avancés pour expliquer le rôle du CV-B4 dans le DT1, comme la cytotoxicité directe envers cellules des îlots, l'activation de lymphocytes T autoréactifs par des superantigènes, le mimétisme moléculaire entre le virus et les antigènes du soi, la persistance virale ou encore l'inflammation induite par l'infection (Jaidane & Hober, 2008). Cependant, même si le lien entre les entérovirus et le DT1 n'est plus à démontrer, un lien de causalité direct entre le DT1 et ces virus comme seuls agents pathogènes n'est pas encore établi.

1.2.2.3 Théorie hygiéniste

L'amélioration des conditions de vie dans les pays développés, notamment de l'hygiène (en particulier qualité microbiologique de l'eau et des aliments, antisepsie..), a conduit à une diminution de l'exposition du nourrisson et du jeune enfant à de nombreux antigènes, ce qui pourrait favoriser le déclenchement du DT1 (Okada et al., 2010; Strachan, 1989). Ainsi, l'augmentation de l'incidence du DT1 est positivement corrélée avec un produit intérieur brut et un niveau de vie socio-économique élevés (Patterson et al., 2001; Torres-Aviles et al., 2010). Le continent européen fait partie des zones les plus touchées dans le monde, caractérisé par un gradient décroissant Nord-Sud (Bodansky et al., 1992). Dans les pays scandinaves (Norvège, Suède, Finlande) qui associent alimentation faiblement diversifiée et des exigences d'hygiène poussée (qualité microbiologique de l'eau et de l'alimentation), les chiffres d'incidence du diabète atteignent des sommets et ne cessent d'augmenter (Soltesz et al., 2007). L'augmentation de l'incidence de DT1 chez les enfants finlandais s'accélère et ne peut s'expliquer par les seuls facteurs génétiques. Ainsi, dans les quinze prochaines années en Finlande, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués chez des enfants de moins de 14 ans devrait doubler avec un déclenchement du diabète plus précoce (entre 0-4 ans) (Harjutsalo et al., 2008).

1.2.2.4 Microbiote intestinal et DT1

- Microbiote et système immunitaire

Le microbiote intestinal représente une communauté écologique complexe qui joue un rôle essentiel en santé humaine. Sa composition est un déterminant majeur de l'éducation et de l'entretien du système immunitaire (Wen et al., 2008). Même si les recherches en sont encore à leurs balbutiements, un nombre croissant d'études mettent en évidence l'association du

microbiote intestinal avec le déclenchement du DT1 (Dunne et al., 2014). La théorie du « perfect storm » pourrait expliquer cette association (Fig. 5) (Vaarala et al., 2008). Ce modèle intègre comme facteurs déterminants un microbiote intestinal déséquilibré et une perméabilité intestinale accrue, conduisant à une réponse immunitaire intestinale altérée.

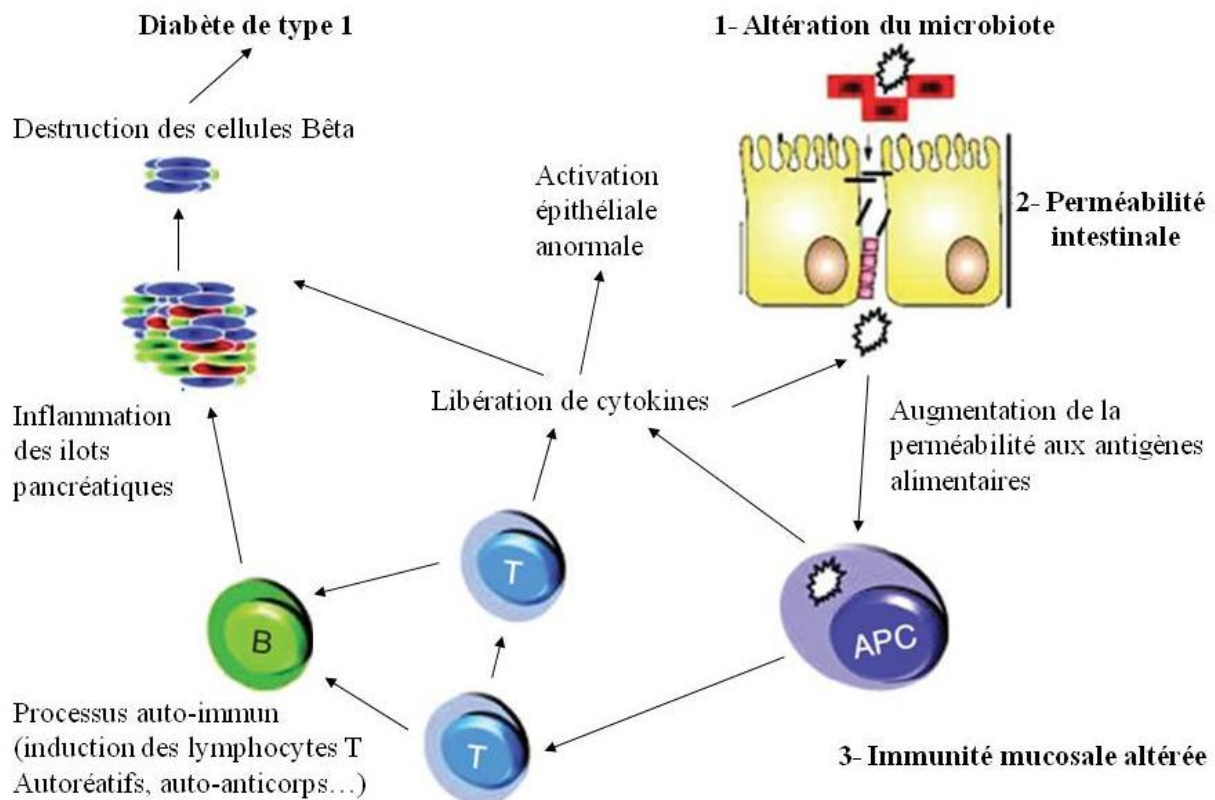


Fig. 5 : Le modèle « perfect storm » et contribution du trio de facteurs intestinaux dans la pathogénèse du diabète de type 1. Adaptée de (Vaarala et al., 2008).

- Composante « Altération du microbiote »

Le développement défectueux du microbiote chez des individus prédisposés génétiquement est supposé entraîner une immuno-régulation anormale aboutissant à la destruction des cellules bêta pancréatiques (Hansen et al., 2012; Olszak et al., 2012). Cette hypothèse est confortée par des études montrant que l'éducation et la maturation du système immunitaire inné sont en grande partie déterminées à un stade précoce de la vie par le microbiote qui

colonise le tube digestif. Dans une cohorte finlandaise, le ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* est plus élevé chez les enfants qui développent un DT1 par rapport aux nourrissons non atteints, 6 mois après la naissance. *Bacteroides ovatus* représente près de 24% de l'augmentation de l'embranchement des *Bacteroidetes* (Giongo et al., 2011). Parallèlement, la souche Firmicute humaine CO19 représente près de 20% de la diminution de l'embranchement des Firmicutes. Une étude espagnole rapporte que le microbiote d'enfants souffrant de DT1 contient des taux élevés de *Clostridium*, *Bacteroides*, et *Veillonella* et une baisse des taux de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* par rapport au microbiote d'enfants en bonne santé (Murri et al., 2013). On peut en déduire que le microbiote des enfants destinés à développer une auto-immunité évolue de façon moins stable et diversifié que celui des enfants en bonne santé. Une étude récente confirme la faible diversité du microbiote chez des enfants avant le déclenchement du diabète (Kostic et al., 2015).

- Composante « Perméabilité intestinale »

La seconde hypothèse, indépendante ou conséquence de la première, met en avant l'état physiologique de l'intestin dans le processus de déclenchement du diabète. Ainsi, l'augmentation de la perméabilité intestinale à un stade précoce de la maladie (avant la survenue de l'hyperglycémie) a été observée chez l'Homme et dans les modèles murins du DT1 (Bosi et al., 2006; Carratu et al., 1999; Kuitunen et al., 2002). Chez des patients atteints du DT1, la structure intestinale est altérée au niveau des microvillosités et des jonctions serrées où l'on observe une augmentation du taux de zonuline favorisant la perméabilité intestinale (Sapone et al., 2006; Secundulfo et al., 2004). Cette déficience pourrait être une des composantes à l'origine de la survenue de la maladie en favorisant l'émergence d'un état pro-inflammatoire. Ainsi, des études montrent le recrutement de cellules de l'inflammation et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans l'intestin de patients diabétiques ainsi

qu'une réduction des cellules régulatrices de l'immunité (Badami et al., 2011; Tiittanen et al., 2008).

- Influence du mode d'accouchement sur le DT1

En 2008, une méta-analyse de 20 études confirme l'augmentation du risque de déclenchement du DT1 chez les enfants nés par césarienne, de l'ordre de 20% (Cardwell et al., 2008). Cette augmentation est indépendante des facteurs comme l'âge maternel, le poids à la naissance et l'allaitement. Elle pourrait être le reflet de la différence d'exposition aux bactéries à ce stade précoce. En effet, l'absence de contact avec le biotope vaginal et rectale de la mère est critique dans l'établissement de la flore intestinale. Le mode d'accouchement influe sur la colonisation bactérienne intestinale (Salminen et al., 2004). On observe le reflet de la flore maternelle vaginale (*Lactobacillus*, *Prevotella* et *Sneathia*) chez les enfants mis au monde par voie basse alors que le microbiote des enfants nés par césarienne est le reflet de la flore maternelle cutanée (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, et *Propionibacterium*) (Dominguez-Bello et al., 2010).

- Allaitement maternel et DT1

En 1984, une équipe de chercheurs danois ont été les premiers à mettre en évidence l'effet protecteur de l'allaitement sur le DT1. Ils émettent alors le postulat qu'un allaitement insuffisant chez des nouveau-nés génétiquement prédisposés peut conduire à l'infection des cellules bêta et au développement tardif du DT1 (Borch-Johnsen et al., 1984). De nombreuses études ont ensuite démontré une association entre l'allaitement et le DT1. Ainsi, une méta-analyse (27 études de cas-témoin et une cohorte) a révélé que l'absence d'allaitement maternel ou pendant une courte période est associée au DT1 (13/27) et constitue un risque majeur de développer la maladie (7/27) (Patel et al., 2012). Une seule étude sur 27 a

montré une association inverse entre l'allaitement et le DT1. Les bienfaits de l'allaitement sur le déclenchement du DT1 sont attribués à la combinaison de substances bioactives connues (IgA, facteurs de croissance, cytokines) et d'autres encore inconnues qui participeraient à la maturation du système immunitaire, seraient en faveur d'une diminution de la résistance à l'insuline et de la prévention de gain de poids excessif pendant l'enfance (Garofalo, 2010; Pereira et al., 2014).

D'autre part, il apparaît que l'introduction précoce du lait de vache et d'autres substituts du lait maternel augmente le risque de développer le DT1 par rapport à l'allaitement maternel exclusif durant quatre mois après la naissance (Abdel-Megeid, 2011; Patelarou et al., 2012). Au Brésil, une étude montre que 84% des enfants diabétiques avaient été exposés au lait de vache avant l'âge de quatre mois, alors que ce pourcentage était de 64,1% dans le groupe témoin (Medeiros, 2003). Les résultats d'une étude épidémiologique mondiale montrent également une corrélation entre la consommation de lait de vache et l'incidence du DT1 qui étaye l'hypothèse de facteurs de déclenchement du DT1 dans le lait de vache (Dahl-Jorgensen et al., 1991). La détection d'anticorps anti-albumine de sérum bovin chez des patients souffrant de DT1 pourrait indiquer que l'albumine bovine est impliquée dans le déclenchement de la réponse auto-immune conduisant au diabète (Luopajarvi et al., 2008). Mais on peut également se poser la question de la diversité du microbiote du lait maternel comme facteur de prévention du DT1. Au delà de l'aspect nutritionnel du lait maternel ainsi que de son rôle régulateur du microbiote via ses oligosaccharides et mucines, l'allaitement est une source de bactéries commensales mutualistes potentiellement probiotiques pour l'intestin du nourrisson. Le microbiome du lait maternel est composé en majeure partie de staphylocoques, streptocoques, de bactéries lactiques et de bifidobactéries (Fernandez et al., 2013). Plusieurs études apportent des éléments de preuve indiquant qu'il existe une transmission de la mère allaitante à son enfant de souches bactériennes appartenant, au moins,

aux genres *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, et *Bifidobacterium* (Martin et al., 2003). Parmi les bifidobactéries présentes dans le lait de femme, *Bifidobacterium longum* est l'espèce la plus largement répandue suivie par *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium catenulatum* (Gueimonde et al., 2007). Cette communauté bactérienne varie en fonction de l'individu et l'état de santé des femmes au cours de la lactation (Cabrera-Rubio et al., 2012).

Une étude récente ayant montré que des souches de *Bifidobacterium* isolées de lait maternel avaient des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires *in vitro*, on peut poser l'hypothèse que la composition du lait de femme peut jouer un rôle dans le développement du diabète (Chiua, 2014).

Outre le fait d'être porteur de bifidobactéries, le lait de femme est composé d'oligosaccharides étant en grande partie responsable de la colonisation dominante du genre *Bifidobacterium* (Coppa et al., 2004). Mais la composition en oligosaccharides reste liée aux groupes sanguins des mères (Stahl et al., 2001; Zivkovic et al., 2011). La variabilité des microbiotes intestinaux du bébé reflètera la répartition des groupes sanguins dans la population, comme le montre chez l'adulte la relation entre bifidobactéries intestinales et gène *fut2* (Wacklin et al., 2011).

1.2.3 Contribution des études chez l'animal

Les deux principaux modèles d'étude du diabète spontanée de type 1 chez l'animal sont les souris de lignée NOD et les rats BB. Nous nous sommes focalisés sur le modèle NOD pour la mise en évidence des propriétés bifides (chap.4 ci-après).

1.2.3.1 Le modèle NOD

Les souris de la lignée NOD développent spontanément un diabète ressemblant au DT1 humain. Cette lignée a été découverte dans les années 80 par des chercheurs japonais à partir d'une lignée de souris ICR (Makino et al., 1980). Chez la souris NOD, la pathogénèse du DT1 se caractérise par insulite chez les souris âgées de 4-5 semaines, qui entraîne une destruction progressive et sélective des cellules Beta pancréatiques aboutissant à un diabète vers la 12e semaine. Il existe néanmoins deux différences majeures avec la pathologie humaine. Premièrement, l'incidence du diabète est plus importante chez les souris femelles (60-80% à 40 semaines) que chez les mâles (20-30%) (Markle et al., 2013). La prévalence liée au sexe n'est pas retrouvée chez l'être humain. Deuxièmement, la singularité du modèle NOD est aussi due à la consanguinité des souris lignée NOD qui partagent donc le même terrain génétique contrairement à la pathologie humaine.

1.2.3.2 Génétique des souris NOD

Toutefois, les facteurs génétiques impliqués dans l'apparition du DT1 sont très proches de ceux retrouvés chez l'Homme. En effet, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est également impliqué dans le déterminisme du DT1 chez la souris NOD. La région correspondant à l'haplotype H2 située sur le chromosome 17 correspondant à la molécule de CMH de classe II (I-Ag7) incriminée chez la souris est homologue à la région DQ8 de l'haplotype HLA humains de prédisposition (Kwok et al., 1996). A ce titre, la lignée NOD constitue un modèle privilégié pour l'identification d'autres gènes de prédisposition.

1.2.3.3 Mécanisme cellulaire d'initiation du DT1 chez les NOD

Chez l'être humain et la souris, la destruction des cellules beta lors de la phase inflammatoire d'insulite fait suite à une réaction auto-immune dépendante des lymphocytes T (Bergerot

et al., 1997). Ainsi, les souris NOD-nu/nu athymiques ne développent ni insulite ni diabète. En revanche le seul transfert des LT CD4⁺ à ces souris entraîne un diabète. Le transfert concomitant de LT CD8⁺ augmente la vitesse de déclenchement du processus inflammatoire auto-immun (Yagi et al., 1992). A l'inverse, l'injection d'anticorps permettant de bloquer l'activité des LT CD4⁺ prévient le déclenchement du diabète (Kikutani & Makino, 1992). L'activation des lymphocytes T passe par l'intermédiaire des cellules dendritiques et macrophages présents majoritairement dans les îlots de Langerhans à un stade précoce de l'insulite (Yoon et al., 1998). Suite à la capture d'auto-antigène de cellules bêta, les cellules dendritiques et macrophages contribueraient à constituer un environnement immunitaire propice au développement de l'auto-immunité par l'activation de lymphocyte T cytotoxiques contre les cellules Bêta. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ ont un rôle d'effecteurs dans la destruction des cellules β pancréatiques (Yoon & Jun, 2001).

1.2.3.4 Influence du microbiote chez les souris NOD

Le rôle du microbiote dans l'émergence du diabète chez les souris NOD a été mis en évidence (Atkinson & Chervonsky, 2012). Ainsi, des souris NOD élevées dépourvues de germes (Germ-Free = GF) développent un diabète avec une incidence supérieure à celle des souris NOD élevées dans des conditions conventionnelles.

Chez ces souris, l'absence de microbiote intestinale se traduit par une différenciation déséquilibrée des lymphocytes auxiliaires Th1, Th17 et Treg dans l'intestin accélérant la survenue de l'insulite (Alam et al., 2011). La contamination de souris NOD GF, par des bactéries filamenteuses segmentées (SFB), retarde le déclenchement et réduit l'incidence du diabète (King & Sarvetnick, 2011; Kriegel et al., 2011). Par ailleurs, chez des souris NOD MyD88⁻, déficient pour un adaptateur de multiples récepteurs immunitaires innés qui reconnaissent les stimuli microbiens, ne développent pas le diabète (Wen et al., 2008).

Les résultats obtenus chez les rats BB-DP viennent étayer ceux obtenus chez la souris NOD. On distingue deux sous-populations en fonction de la résistance au diabète et l'analyse comparative de la communauté microbienne intestinale de rats BB-DP (sensible) et BB-DR (résistant) à un stade précoce de la maladie montre de grandes différences. Une plus grande proportion des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* est observée dans les selles des rats BB-DR alors que les genres *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Eubacterium* sont plus abondants chez les rats BB-DP (Roesch et al., 2009).

L'alimentation est un facteur pouvant modifier le microbiote intestinal et donc modulant le développement du diabète. Ainsi l'administration du lactose favorise non seulement les bifidobactéries mais également les clostridies (Mielcarek et al., 2011). Par ailleurs, certaines entérotoxines de *Clostridium perfringens* peuvent se lier à des claudines spécifiques, ce qui entraîne la désintégration des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité intestinale (Saitoh et al., 2015).

Or, chez les rats BB-DP, une perméabilité intestinale accrue a été observée avant le déclenchement du diabète (Neu et al., 2005). Cette altération permet le passage non régulé des antigènes environnementaux susceptibles de déclencher la réponse auto-immune conduisant au diabète. Ainsi, Lee et al. montrent qu'une perte de l'intégrité de la barrière intestinale provoquée par un pathogène entérique (*Citrobacter rodentium*) a pour conséquence l'activation de LT CD8+ diabéto-gène et l'accélération de la survenue de l'insulite (Lee et al., 2010).

1.3 Probiotiques, prébiotiques et métabolites fermentaires

Aujourd'hui, l'implantation d'une flore favorable chez le nouveau né constitue un enjeu de taille en santé publique et pour l'industrie des préparations lactées infantiles. Plusieurs stratégies sont mises en place, en particulier pour mimer les effets bénéfiques du lait maternel.

1.3.1 Probiotiques

La première d'entre-elles est l'utilisation de probiotiques définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont un bénéfice pour la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2010). Au début du 20ème siècle, la naissance du concept de probiotique apparaît avec le postulat de Metchnikoff liant l'augmentation de l'espérance de vie chez des paysans bulgares à la consommation régulière de produits laitiers fermentés (Metchnikoff, 1908). Depuis lors, les probiotiques rentrent dans la composition de nombreux produits alimentaires (yaourts, fromages, céréales...) et le marché ne cesse de croître atteignant 4 milliards de dollars en 2007 (report, 2008).

Le Lacteol[®] (Aptalis Pharma) est un des premiers médicaments à base de probiotiques (souches de *Lactobaccillus* inactivées) à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché pour ses propriétés anti-diarrhéiques. Outre les lactobacilles, la majorité des effets-santé notoires des probiotiques sont attribués aux bifidobactéries et sont souches-dépendantes (Leahy et al., 2005).

Les bifidobactéries interviennent aussi bien dans la prévention que dans le traitement d'un large spectre de troubles gastro-intestinaux chez l'Homme et les animaux (Diaz et al., 2004; Kullen & Bettler, 2005; Szajewska et al., 2006). Parmi leurs effets bénéfiques, on peut citer la

réduction de l'intolérance au lactose (He et al., 2008), la diminution du cholestérol (Ataie-Jafari et al., 2009), la réduction de l'inflammation intestinale ou encore l'immuno-stimulation (McCarthy et al., 2003; O'Mahony et al., 2005) et l'effet barrière vis-à-vis d'agents pathogènes (Qiao et al., 2002; Rafter et al., 2007). Pour atteindre un bénéfice santé (réduction de l'intolérance au lactose, réduction des infections intestinales...), il serait nécessaire d'apporter au niveau colique 10^7 UFC/g de contenu intestinal (Stanton et al., 2001).

Les espèces de *Bifidobacterium* peuvent avoir des effets différents sur le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, la supplémentation en *B.longum* engendre une diminution de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, alors que l'administration de *B. animalis subsp. lactis* provoque une augmentation d'IFN- α et de l'activité phagocytaire chez l'Homme (Arunachalam et al., 2000; Furrie, 2006).

L'administration de souches probiotiques du genre *Lactobacillus* à un stade précoce prévient le déclenchement du diabète chez des rats BB-DP et des souris NOD (Matsuzaki et al., 1997; Valladares et al., 2010). Une prévention est également observée chez des souris NOD conventionnelles nourries trois fois par semaine avec un mélange des probiotiques comprenant l'espèce *B.longum* (Calcinaro et al., 2005). Les mécanismes liant l'administration de probiotiques et la prévention du diabète ne sont pas encore connus. Cependant, une des hypothèses les plus probables serait que la prévention du diabète passerait par une fortification de la muqueuse intestinale et une régulation de la translocation bactérienne.

De ce fait, l'administration précoce de probiotiques et en particulier de bifidobactéries dont les effets sur la régulation de la translocation bactérienne ont déjà été démontrés pourraient s'avérer un outil efficace dans la prévention du DT1 (Romond et al., 2008; Romond et al., 1997b).

1.3.2 Prébiotiques

Les prébiotiques sont des oligosaccharides ou polysaccharides indigestes pour la machinerie enzymatique humaine. L'atome de carbone anomérique des unités monosaccharidiques des oligosaccharides alimentaires a une configuration qui rend leurs chaînes osidiques non hydrolysables par les enzymes digestives humaines (Roberfroid & Slavin, 2000). Les prébiotiques sont par contre métabolisés par des bactéries intestinales, dont celles pouvant améliorer la santé de l'hôte (Gibson et al., 2004). Certains prébiotiques sont présents naturellement dans le monde végétale (fruits, le miel les céréales) alors que d'autres sont produits ou synthétisés dans l'industrie. Parmi ces sucres, on peut citer les fructo-oligosaccharides (FOS), les galacto-oligosaccharides (GOS), les gluco-oligosaccharides, les xylo-oligosaccharides, l'arabinoxylane, l'arabinogalactane, le lactulose, l'inuline, l'amidon et le raffinose (Guarner & Malagelada, 2003) Les bifidobactéries coliques sont capables de fermenter et d'utiliser ces produits non assimilables et d'en tirer profit pour favoriser leur colonisation (Kaplan & Hutkins, 2000). Cependant l'utilisation de ces sucres par les bifidobactéries est sélective. Par exemple, elles prolifèrent en présence de GOS et de lactulose alors que leur croissance est très faible en présence de maltodextrine, inuline et polydextrose (Watson et al., 2013). Toutes les espèces bifides ne sont pas égales devant la métabolisation de ces prébiotiques. L'espèce *B.longum subsp.infantis* s'est adaptée génétiquement pour métaboliser les glycanes produits par l'hôte comme la mucine ou les oligosaccharides du lait maternel et en tire avantage pour son implantation au détriment d'autres souches bifides ou d'autres compétiteurs (Sela et al., 2008).

Au niveau industriel, l'objectif de développement de prébiotiques est de mimer l'effet bifidigène du lait maternel. Cependant, cette approche physiologique est ardue du fait de la complexité de la composition oligosaccharidique du lait maternel. Néanmoins, plusieurs

études ont montré que l'administration d'une formule composée de galacto-oligosaccharides et fructo-oligosaccharides en rapport 9/1 (ratio proche de celui du lait maternel) a un effet bifidigène semblable à celui observé chez le nourrisson allaité (Haarman & Knol, 2005; Knol et al., 2005; Rinne et al., 2005). La majorité des substituts oligosaccharidiques du lait maternel ont démontré leur efficacité au cours des premières semaines. Leurs effets bifidigènes à des stades plus tardifs restent encore à démontrer.

1.3.3 Métabiotiques

A l'interface entre les probiotiques et les prébiotiques, Shenderov a introduit en 2013 le concept de métabiotique (Shenderov, 2013). Les métabiotiques sont décrits comme étant des composants structuraux de micro-organismes probiotiques et / ou leurs métabolites et / ou des molécules de signalisation avec une structure chimique connue pouvant optimiser les fonctions physiologiques de l'hôte en régulant l'activité du microbiote endogène. Ce concept part du constat que les probiotiques peuvent parfois avoir des effets incertains, ou uniquement à court terme voire inexistant dans certains cas. Cette variabilité pourrait être expliquée par la difficulté d'estimer la concentration en composés bioactifs de ces probiotiques et le manque de spécificité de distribution à la cible (Reid et al., 2011). De plus, l'innocuité de certains probiotiques est aujourd'hui mise en cause et leur implication dans des troubles pathologiques comme des infections opportunistes, des déséquilibres microbiologiques ou une sensibilisation accrue dans des processus auto-immuns est désormais reconnue (Cannon et al., 2005; Ohishi et al., 2010; Vesterlund et al., 2007). Les métabiotiques possèdent l'avantage d'avoir une structure chimique connue et par conséquent un dosage plus aisé et une durée de vie quantifiable. Par ailleurs, les critères d'absorption, de métabolisme et de distribution sont contrôlés et donc améliorés par rapport aux probiotiques. Les métabiotiques constitueraient

donc l'évolution naturelle du concept de probiotique, par la connaissance de leur mécanisme d'effet et leur spécificité dans la prévention et le traitement des pathologies lié à un déséquilibre du microbiote de l'hôte.

Actuellement, des métabiotiques potentiels sont en cours de développement à partir de métabolites ou molécules de surface de lactobacilles et de bifidobactéries tels que des adhésines (Lebeer et al., 2008; Lebeer et al., 2010), des biosurfactants (Lakhtin, 2010), des lectines (Lakhtin et al., 2006), diverses molécules de la paroi cellulaire (Caselli et al., 2011) attachées aux cellules ou secrétées dans le milieu.

Bien que ce concept soit récent, l'utilisation de métabiotiques a déjà fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, Romond et al. ont démontré qu'un lactosérum exempt de cellules provenant de la fermentation du lait avec la souche *Bifidobacterium breve* C50 favorise la prolifération des bifidobactéries intestinales (Romond et al., 1998). Parallèlement, les groupes *Bacteroides fragilis* et *Clostridium* (généralement considérée comme des bactéries potentiellement nocives) sont réprimées. Cependant, aucune activité anti-microbienne *in vitro* n'a pu être détectée (Romond et al., 1997a). L'activité de ce lactosérum est portée par des métabolites de haut poids moléculaires (>300 kDa) capables à eux seules de reproduire les mêmes effets sur la flore intestinale (Mullie et al., 2002). Les composés de haut poids moléculaire induisent également la maturation de cellules dendritiques et prolongent leur survie par l'intermédiaire d'une interaction avec le TLR2 (Hoarau et al., 2006). La survie prolongée des cellules dendritiques passe par la voie du phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Hoarau et al., 2008). Une formule infantile (Calisma®, Blédina) fermentée en particulier par la souche *B.breve* C50 et démunie de bifidobactéries vivantes, reproduit chez l'adulte les effets sur le microbiote observés avec le lactosérum seul et diminue la sévérité de diarrhées chez le nourrisson (Romond et al., 1998; Thibault et al., 2004). Enfin, l'allaitement de nourrissons au cours des 4 premiers mois par la formule infantile fermentée induit une

augmentation des bifidobactéries fécales et améliore la réponse vaccinale anti-poliovirus (Mullie et al., 2004).

En outre, des facteurs solubles de bas poids moléculaire (<3 kDa) libérés par *B.breve* C50 peuvent réduire la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et induire une protection des souris contre la colite induite par le TNBS (Heuvelin et al., 2009; Menard et al., 2004).

L'utilisation de métabolites de *Bifidobacterium* a fait l'objet de plusieurs brevets avec différents domaines d'applications. En 2009, Herranz et al. ont déposé un brevet concernant l'utilisation des composants du surnageant de culture de la souche *B.bifidum* IATA-ES2 revendiquant la régulation de la glycosylation intestinale, la modulation de la flore intestinale en favorisant l'adhérence des bifidobactéries bénéfiques et la régulation des réponses immunologiques (WO2010007198A1).

Plus récemment, l'utilisation des souches *B.pseudocatenulatum* CECT 7765 et *B.animalis* subsp.lactis CECT 8145 ainsi que leurs métabolites et molécules sécrétés a été brevetée dans la prévention et le traitement du surpoids, de l'obésité et des pathologies associées telles que l'inflammation ou le diabète de type 2 (WO 2015007941 A1 ; WO 2012076739 A1).

D'autres bifidobactéries présentent des composés de paroi pouvant à terme être utilisés comme métabiotiques. Ainsi Guglielmetti et al. observent que la protéine TgaA isolée de la paroi de *B.bifidum* MIMBb75 est capable d'activer les cellules dendritiques par l'intermédiaire de son domaine CHAP (amidohydrolase/peptidase cystéine et histidine dépendante) (Guglielmetti et al., 2014). D'autre part, les bifidobactéries produisent un facteur protéique (>100kDa) empêchant la liaison de souches pathogènes d'*E.coli* à la surface de la muqueuse intestinale (Fujiwara et al., 1997).

Conclusion

Les bifidobactéries, mieux décrites grâce aux technologies moléculaires, sont reconnues pour leur impact positif en santé humaine. Certaines propriétés peuvent être liées à leur capacité de sécrétion de composés de haut poids moléculaire lors de la fermentation bactérienne (modulation du microbiome, régulation de la translocation bactérienne, maturation de cellules dendritiques). Cependant la description des composés actifs est imparfaite. Pour une exploitation raisonnée et standardisée des bifidobactéries sous forme de probiotiques ou de métabiotiques, il est nécessaire d'analyser de façon plus détaillée les structures impliquées dans les effets physiologiques. Les perspectives d'application, en particulier en prévention de maladies comme le diabète de type 1, en seront renforcées. Des métabiotiques bifides administrés à un stade précoce pourrait en effet prévenir le déclenchement du DT1 en tant que modulateur du microbiote et régulateur de la translocation bactérienne.

Objectifs

Mon travail a pour objectifs de :

- 1) caractériser les composés de haut poids moléculaire modulant l'immunité, sécrétés par la souche *B.breve* C50 de référence,
- 2) détecter des composés de structure similaire chez d'autres espèces de bifidobactéries,
- 3) déterminer leur activité de régulation de la translocation bactérienne et leur mécanisme d'action potentiel (capture cellulaire),
- 4) rechercher des bifidobactéries dans le lait maternel dans les premiers jours après la naissance,
- 5) analyser l'effet potentiellement protecteur des composés associés aux bifidobactéries vis-à-vis du diabète de type 1.

CHAPITRE 2 : Caractérisation des molécules bifides

2.1 Caractérisation des molécules de *B.breve* C50

Article publié dans le journal Biochimie :

Scuotto A, Djorie S, Colavizza M, Romond PC, Romond MB. “*Bifidobacterium breve* C50 secretes lipoprotein with CHAP domain recognized in aggregated form by TLR2.” Biochimie. 2014 Dec;107 Pt B:367-75.

2.1.1 Résumé

Les composés extracellulaires sécrétés par *Bifidobacterium breve* C50 peuvent induire la maturation, la production élevée d'IL-10 et la survie prolongée des cellules dendritiques par l'intermédiaire de la voie du TLR2. Dans cette étude, les composés ont été isolés par gel filtration à partir du surnageant de culture. Des anticorps dirigés contre les composés de poids moléculaire supérieur à 600 kDa (Bb C50_{BC}) reconnaissent également des composés de poids moléculaire inférieur (200-600 kDa). L'ensemble des composés est reconnu par les récepteurs, TLR2 et TLR6. La digestion trypsique de Bb C50_{BC} libère trois principaux peptides dont les séquences affichent une homologie élevée avec celle d'une protéine hypothétique comprenant un domaine CHAP/amidase de *B.breve*. La région génomique de 1300 pb correspondant à la protéine hypothétique est amplifiée par PCR. Le polypeptide déduit débute en position N-terminale par une séquence signal de 45 acides aminés, contenant le motif lipobox (LAAC) avec une cystéine en position 25 et deux résidus chargés positivement dans les 14 premiers résidus de la séquence signal. La détection de lipides par

GC/MS conforte l'hypothèse d'une structure lipoprotéique. Des sucres sont également détectés. La forte homologie de deux peptides libérés de Bb C50_{BC} avec une protéine de type récepteur B de glucanes de *B.animalis* laisse à penser que la lipoprotéine se lie à des unités de glucose, éventuellement sous forme de glucanes. Enfin, le chauffage à 100 °C pendant 5 min conduit à la rupture de Bb C50_{BC} en composés de poids moléculaire inférieur à 67 kDa, ce qui suggère que Bb C50_{BC} est un agrégat. On peut penser que l'unité de base est formée par la structure lipoprotéine liée à un glucane. Les sucres reconnus par la galectine 1 sont localisés à la surface des agrégats de Bb C50_{BC}. En conclusion, les composants extracellulaires sécrétés par *Bifidobacterium breve* C50 sont constitués d'une lipoprotéine associée à des fragments de glucose et agissent dans une forme agrégée, comme agoniste des TLR2/TLR6.

2.1.2 Introduction

Il existe un intérêt croissant pour l'administration de bactéries probiotiques dans la prévention et le traitement des maladies inflammatoires et allergiques. Les bifidobactéries seules ou en mélange avec des lactobacilles sont utilisées pour soulager le syndrome du côlon irritable et prévenir le développement de l'eczéma chez les nourrissons présentant un risque élevé d'allergies avant un an (Brenner et al., 2009; Dang et al., 2013; Guglielmetti et al., 2011; Kim et al., 2010). La prise de bifidobactéries peut en outre entraîner une réduction de biomarqueurs pro-inflammatoires systémiques dans la colite ulcéreuse, le syndrome de fatigue chronique et le psoriasis (Groeger et al., 2013). *In vitro*, plusieurs souches de bifidobactéries induisent une réponse des cellules immunitaires (Lopez et al., 2010; Young et al., 2004). De même, des bifidobactéries vivantes ou inactivées par la chaleur ainsi que leurs composants peuvent activer des réponses immunitaires *in vitro* (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014a). *In vivo*, une formule infantile fermentée par des bifidobactéries, mais démunie de bactéries

vivantes amplifie la réponse IgA à la vaccination par le poliovirus (Mullie et al., 2004). Certains composés générés pendant la fermentation seraient impliqués dans cet effet adjuvant. En fait, les premières étapes du déclenchement de la réponse immunitaire innée impliquent l'activation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour « pattern recognition receptor ») par des molécules bactériennes appelées motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP pour « pathogen-associated molecular patterns »). Parmi ces récepteurs, la famille des récepteurs Toll-like (TLR), en particulier le TLR2, joue un rôle crucial dans la détection des bifidobactéries (Weiss et al., 2011; Young et al., 2004; Zeuthen et al., 2008). Les TLRs qui sont exprimés de manière constitutive sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (CD), sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, dont l'ectodomaine solénoïde coopère avec les PAMPs. Toutefois, la voie des TLR peut induire une grande variété de voies de transduction du signal pour réguler la nature, l'ampleur et la durée de la réponse immunitaire (Qian & Cao, 2013). En outre, la dimérisation du TLR2 avec d'autres membres de la famille des TLRs, comme le TLR1 et TLR6, permet aux TLR2 de reconnaître les différents composants microbiens et de choisir entre des agonistes montrant des différences ténues (Akira et al., 2006). La reconnaissance des agonistes du TLR2 est également influencée par des co-récepteurs et des molécules accessoires, tels que le CD14, le CD36, le MD-2, le « lipopolysaccharide-binding protein » (LBP), les intégrines CD11b-CD18, et le ganglioside GD1a (Dziarski et al., 2001; Hajishengallis et al., 2005; Henneke et al., 2001; Hoebe et al., 2005; Liang et al., 2007; Schroder et al., 2004). La complexité du TLR2 complique donc la description d'agonistes bactériens. Seuls quelques agonistes de bifidobactéries sont décrits jusqu'à présent (Blanc et al., 2013; Sanchez et al., 2010). Le but de ce travail est d'isoler et de caractériser les composés bifides (BCs) capable de lier le TLR2. Les composés sécrétés par *Bifidobacterium breve* C50 au cours de la fermentation induisent la maturation des cellules dendritiques et prolongent leur

survie par l'intermédiaire d'une interaction avec le TLR2 (Hoarau et al., 2006). La survie prolongée des cellules dendritiques passe par la voie du phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Hoarau et al., 2008). Les facteurs solubles de bas poids moléculaire (<3 kDa) libérés par *B.breve* C50 peuvent réduire la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et induire une protection des souris contre la colite induite par le TNBS (Heuvelin et al., 2009; Menard et al., 2004). Cependant, les composés issus de la fermentation de bifidobactéries induisant une survie DC prolongée sont de haut poids moléculaire (>300 kDa). La différence de production d'IL-10 par les cellules dendritiques en fonction de l'incubation avec les composés non identifiés ou des facteurs de bas poids moléculaire solubles suggère que *B. breve* C50 produit divers agonistes du TLR2.

Les BCs de poids moléculaire élevé ont donc été purifiés par gel filtration (GF) et les fractions isolées ont été testées pour leur capacité à lier le TLR2 et le TLR6 (Takeuchi & Akira, 2010). En analysant la composition biochimique des ces composés et leur sensibilité à l'hydrolyse acide, nous avons montré que les BCs de poids moléculaire élevé se liant à TLR2/TLR6 étaient constitués d'unités de lipoprotéines probablement associées à des fragments de sucre, le tout sous une forme agrégée formant un complexe de haut poids moléculaire.

2.1.3 Matériels et Méthodes

2.1.3.1 Production du surnageant de *B.breve* C50

La production du surnageant de *B.breve* C50 est réalisée selon la description faite par Hoarau et al. (Hoarau et al., 2006). En résumé, la souche Bb C50 isolée de selles de nourrissons, est cultivée dans un bouillon reproduisant en partie la composition du lait (70 g de lactose, 10g de

protéines de lait hydrolysées et 0,03 g de chlorhydrate de cystéine par litre). Le bouillon inoculé est incubé 15 heures à 37°C en condition anaérobie. Le surnageant du milieu de culture est recueilli après centrifugation à haute vitesse, puis concentré par ultrafiltration (>100 kDa) et dialysé sur une membrane de filtration de seuil de coupure de 10 kDa. Le surnageant ainsi concentré est nommé Bb C50_{SN}, et est lyophilisé avant utilisation.

2.1.3.2 Isolement des composés bifides

Bb C50_{SN}, contenant les composés de haut poids moléculaire (> 100 kDa), est soumis à une chromatographie d'exclusion sur gel Superdex ® 200 (Sigma-Aldrich). Le pic exclu (Bb C50_{BC}) et les deux pics retenus (RP1, RP2) sont collectés et lyophilisés avant utilisation. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). L'hydrolyse de Bb C50_{BC} est tentée par traitement acide à chaud avec, soit de l'acide chlorhydrique (0,6 M), soit de l'acide acétique (1 à 8 M) ou de l'acide orthophosphorique (0,7 M) pendant 5 min à 100 °C. Les composés libérés sont analysés par gel filtration.

2.1.3.3 Dosage ELISA

Pour déterminer quel composé bifide est reconnu par les récepteurs TLRs, les fractions Bb C50_{SN}, Bb C50_{BC}, RP1 et RP2, diluées dans du tampon carbonate (0,05 M pH 9,6) sont adsorbées sur le plastique de puits de microplaques (Corning ® 96 et EIA / RIA) à 4 °C pendant une nuit. Après 5 lavages avec du tampon PBS (10 mM de PBS - 0,05% de Tween 20), suivis d'une incubation avec une solution de saturation (10 mM de PBS - 0,5% de Tween 20 à 2% de BSA), la protéine TLR2 recombinante ou TLR6 recombinante de souris (R & D Systems) est ajoutée dans les puits. L'interaction entre composés de bifidobactéries et récepteur TLR est révélée par addition d'anticorps monoclonaux anti-IgG biotinylés (Sigma Aldrich) incubés à 37 °C pendant 1 h, suivie d'une incubation avec de la Streptavidin-

peroxydase (Sigma Aldrich) puis de l'OPD SIGMAFAST™ (Sigma Aldrich). La réaction est arrêtée par addition de 50 µl d'acide sulfurique (0.5M) par puits. La densité optique (DO) est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan®EX-ThermoScientific).

Pour déterminer où les hexosamines et les résidus galactose sont localisés, on remplace les TLRs par les galectines 1 (13 nM) ou 3 (8 nM) (R & D Systems) et les anticorps par des anticorps biotinylés anti-Gal-1 et -3 (R & D Systems). Parallèlement, Bb C50_{BC} est soumis à plusieurs traitements : chauffage (75°C, 5min), ultrafiltration avec une membrane avec un seuil de coupure de 50 kDa (Pall), et/ou digestion à l'aide du kit Enzymatic Protein Deglycosylation Kit (Sigma Aldrich), puis les produits sont adsorbés dans les puits pour étudier le degré de liaison des hexosamines et du galactose avec Bb C50_{BC}.

Pour déterminer si Bb C50_{BC} et les fractions retenues (RP) portent les mêmes antigènes, deux lapins sont immunisés à l'aide de Bb C50_{BC} et les anticorps polyclonaux sont purifiés à partir du sérum à l'aide des protocoles usuels (Johnston et al., 1991).

2.1.3.4 Analyse des protéines

Le séquençage de la fraction Bb C50_{BC} est effectué après 48h d'incubation avec une solution de trypsine à 1% (Sequencing Grade 120 111 Modified Trypsin, V511A, Promega) dans du tampon TRIS 0,1M pH 8,5. Les peptides libérés sont purifiés par HPLC en phase inverse à l'aide d'une colonne d'un diamètre de 2 mm et une longueur de 200 mm remplie de gel Ultrasphere® ODS (octadécylsilane). L'élution est effectuée avec un gradient linéaire allant jusqu' à 0,1% d'acétonitrile dans de l'acide trifluoroacétique. Les peptides isolés sont séquencés avec un dispositif Procise 492 (Perkin-Elmer).

Les séquences sont ensuite comparées à celles des bases de données GenBank CDS translation, PDB (Protein Data Bank), SwissProt, PIR (Protein Information Resource), PRF

(Protein Research Foundation), pour leurs similitudes avec des peptides d'origine bactérienne, en utilisant le programme BLAST 2.2 (Basic Local Alignment Search Tool) du NCBI.

2.1.3.5 Extraction d'ADN et amplifications

La souche de *B.breve* C50 est cultivée dans un milieu cœur-cervelle (BHI) (Becton Dickinson) et les bactéries sont récoltées après centrifugation (4°C / 11,000 xg / 5 min). Les bactéries sont remises en suspension dans 120 µl de tampon TE (20 mM Tris-HCL, EDTA 2 mM, 1% de Triton X-100). Après addition de 80 µl de lysozyme (50 mg / ml), la suspension de bactéries est incubée pendant 30 min à 37 °C. L'ADN bactérien total est extrait en utilisant le kit NucleoSpin ® Tissue (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'élution est effectuée avec 100 µl de tampon de BE (Macherey Nagel), et les extraits d'ADN purifiés sont stockés à -20°C. Les régions génomiques correspondant aux protéines bifides analogues des peptides séquencés et identifiés par BlastP, sont amplifiées par PCR en utilisant le Mastercycler ® ep Realplex (Eppendorf). Les amorces (Eurogentec) sont répertoriées dans le Tableau 1. Chaque mélange réactionnel de 25µl est composé de PCR Master Mix (Thermo Scientific) contenant 0,625 unités d'ADN Taq polymérase ThermoPrime, de 1,5 mM de chlorure de magnésium, de 0,2 mM de dNTP, de 75 mM Tris-HCl, de 0,01 % de Tween 20®, de 0,5 µM de chaque amorce et de 5 µl d'ADN. Les amplifications sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler ® ep realplex (Eppendorf). La dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes est suivie par 40 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 20 s, une hybridation avec les amorces pendant 30 secondes et à une température comprise entre 54 °C et 63 °C en fonction du type d'amorces utilisées, une étape d'extension à 72 °C pendant 1 min, suivie d'une étape d'extension finale de 5 min à 72 °C. Le séquençage des produits de PCR est réalisé par Genoscreen (Lille, France).

Espèce	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (bp)
<i>B.breve</i>	Forward bre1: TGCGTGATGTTGTCGGTAAT Reverse bre1: TGCATCGAGTTGACGAAGTC	53	779
	Forward bre2: GTACAACCGGCGTAAGGAGA Reverse bre2 : CAACGGCACAATCGTGTATC	60	736

Tableau 2 : Amorces utilisées dans cette étude.

2.1.3.6 Analyse des sucres et des lipides

La composition en sucre de Bb C50_{BC} est analysée dans un premier temps par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un dispositif Trace GC Ultra™ (Thermo Scientific) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne Alltech Econo-Cap-CE 1 (Fischer Scientific) de 30m × 0,25 mm x 0,25 µm.

Les compositions en sucre et en lipide est ensuite analysées par GC/MS-EI avec un dispositif Trace™ GC Ultra couplé à un détecteur de masse quadripole TSQ Quantum (Thermo Scientific) et une colonne de 30m × 0.25mm x 0.25µm SolGel-1ms (SGE Analytical Science). De la lysine (étalon interne) à raison de 0,1 mg/ml est ajoutée à la solution de BbC50_{BC} (1mg/ml) qui est ensuite lyophilisée une nuit. La méthanolyse est effectuée par ajout de 500µl de MeOH/HCl (0,5N). Le mélange est incubé à 80°C pendant 18h et évaporé à sec sous azote. La dérivation est effectuée par ajout de 100µl d'acétonitrile anhydre et de 20µl d'acide heptafluorobutyrique anhydre à l'échantillon. Le mélange est incubé 15 min à 180°C. Après évaporation à sec, 100µl d'acétonitrile anhydre sont ajoutés et 1µl est injecté pour analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Deux programmes sont utilisés pour l'analyse par GC/MS, La méthode 1 se déroule comme suit : 100-140°C (1.2°C/min), 240°C (4°C/min), plateau à 240 °C pendant 10 min (durée de l'analyse: 68.33 min; Temps de Scan: 0.400 ms; Courant: 25 µA). La méthode 2, dédiée à la calibration des acides gras, se déroule de la façon suivante: 50°C pendant 3 min; 50-280°C (5°C/min), plateau à 280 °C pendant 15 min (durée d'analyse: 64 min; Temps de Scan: 0.272 ms; Courant: 25 µA).

2.1.3.7 Outils bioinformatiques

Le BLAST (Local Alignment Search Tool Base) sert à la recherche des similitudes génomiques avec les bases de données GenBank et EMBL. Les séquences d'acides aminés sont soumises à un alignement multiple avec le programme ClustalW2 version 2.1 de l'Institut européen de bioinformatique (<http://www.ebi.ac.uk>) (Larkin et al., 2007). Le logiciel SignalP est employé pour rechercher des structures de peptide signal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP2.0/>).

Le logiciel DOLOP (<http://www.mrcmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/analysis.shtml>) est utilisé pour prédire la présence de lipoprotéines bactériennes. TMHMM version 2.0, PSortB v3.0.2, le serveur CFSSP, et Phyre 2,0 servent respectivement pour la prédiction d'hélice transmembranaire, la localisation subcellulaire, la structure secondaire et la structure tertiaire des séquences d'acides aminés des macromolécules (Gardy et al., 2005; Kelley & Sternberg, 2009).

2.1.3.8 Numéro d'accension

La séquence d'ADN de 1380pb de la protéine Bb C50 a été déposée dans la base de données GenBank sous le numéro d'accension KJ847053.

2.1.4 Résultats

2.1.4.1 Reconnaissance des composés de Bb C50_{SN} par les récepteurs TLR2 et TLR6

L'analyse par chromatographie de gel filtration de du surnageant Bb C50_{SN} montre deux pics principaux, un pic exclu (Bb C50_{BC}) contenant des composés de poids moléculaire supérieur à 600 kDa et un second pic retenu (RP) contenant des composés de poids moléculaire inférieur à 600 kDa (Fig. 7). Bb C50_{BC} est collecté et lyophilisé. RP est recueilli en deux fractions, RP1 comprenant des composés entre 200 et 600 kDa et RP2 avec des composés de poids moléculaire inférieur à 200 kDa.

Les poudres lyophilisées de Bb C50_{BC}, et des deux RP sont pesées. BbC50_{BC}, RP1 et RP2 représentent respectivement environ 70, 8 et 22% des poids de poudres lyophilisées. Bb C50_{SN} et Bb C50_{BC} sont composées respectivement de 416 et 41,6 µg de protéines par mg de poudre lyophilisée.

Les anticorps anti-Bb C50_{BC} ne reconnaissent que Bb C50_{BC} et RP1 (Fig. 6). Bb C50_{SN}, Bb C50_{BC} et les fractions de RP sont également testés pour leur capacité de liaison au TLR2. Bb C50_{SN}, Bb C50_{BC}, et RP1 se lient de manière significative au TLR2, alors que le RP2 n'est pas reconnu (Fig. 7).

Bb C50_{SN}, Bb C50_{BC}, et les RPs sont également testés pour leur capacité de liaison au TLR6. Comme le montre la figure 8, Bb C50_{SN}, Bb C50_{BC} et RP1 sont reconnus de façon plus intense par le récepteur TLR6 que par le récepteur TLR2. Comme précédemment, RP2 n'est pas reconnu par le récepteur TLR6 (données non présentées). Il en résulte que parmi les composés isolés de Bb C50_{SN}, seuls les composés de poids moléculaire élevé sont reconnus par le TLR6 et dans une moindre mesure par le TLR2.

Même si le récepteur TLR6 reconnaît de façon plus intense la fraction RP1, le principal composé de Bb C50_{SN} est Bb C50_{BC}. De ce fait, nous avons approfondi l'analyse de la composition biochimique de Bb C50_{BC}.

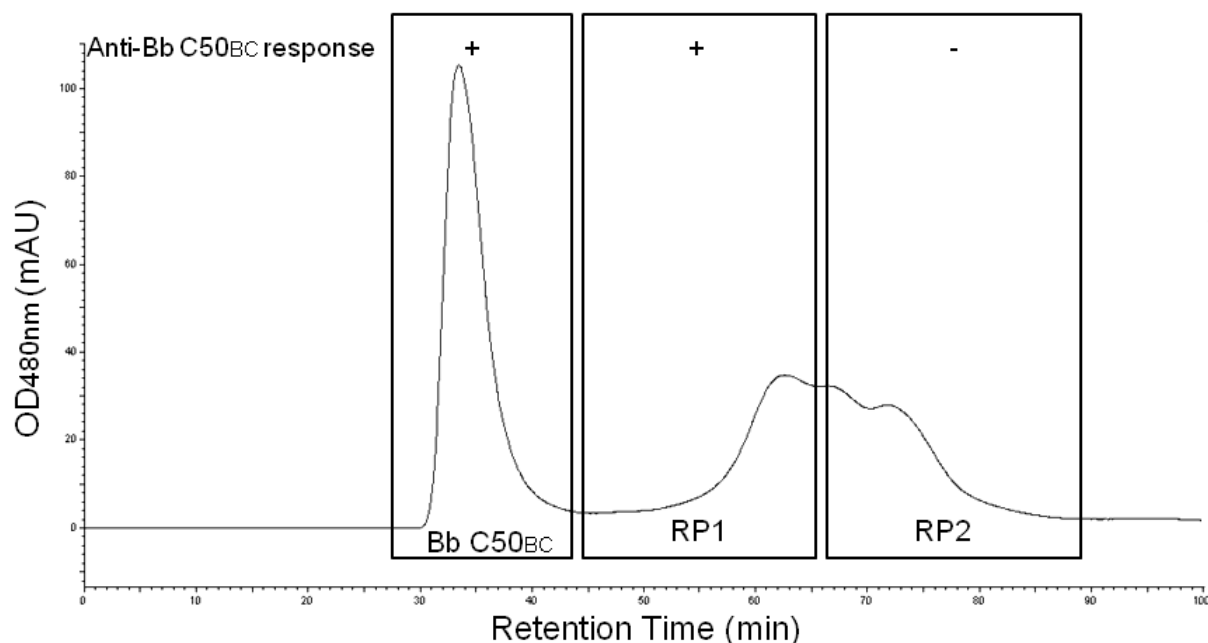


Fig. 6 : Gel filtration de Bb C50_{SN} filtration. Bb C50_{SN} (2 mg de poudre lyophilisée/ml) a été soumis à une gel filtration. Les pics Bb C50_{BC}, RP1 et RP2 ont été collectés respectivement entre 27,5 et 43,5 min ; 44,5 et 65,5 min et 66,5 et 89 min. La liaison de chaque fraction avec les anticorps anti-Bb C50 a été analysée par ELISA. Le (+) correspond aux fractions capables de lier les anticorps anti-Bb C50_{BC}.

2.1.4.2 Traitement acide à chaud de Bb C50_{BC}

La dégradation de Bb C50_{BC} est analysée par chromatographie d'exclusion après un traitement acide à 37°C ou 100°C. Aucune dégradation n'a été observée après 1 h d'incubation à 37 °C avec de l'acide acétique, de l'acide phosphorique ou de l'acide chlorhydrique. L'hydrolyse de Bb C50_{BC} n'est efficace qu'après chauffage à 100°C pendant 5 minutes avec de l'acide acétique, de l'acide phosphorique ou de l'acide chlorhydrique (Fig. 8). Avant hydrolyse, Bb C50_{BC} est élué à 16min (composés de poids moléculaire supérieur à 600 kDa).

Le pic exclu a presque disparu après hydrolyse et a été remplacé par au moins cinq pics avec des temps de rétention compris entre 32 min à 65 min correspondant à des composés de poids moléculaire inférieur à 67 kDa.

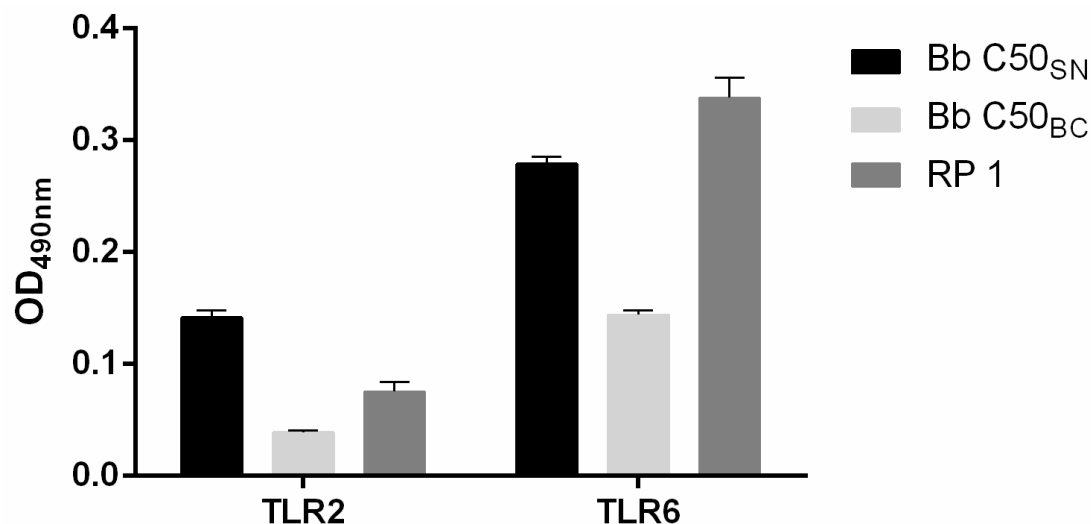


Fig. 7 : Reconnaissance de Bb C50_{SN} et des fractions avec les TLR2/6. Les poudres lyophilisées de chaque échantillon (15 µg) ont été testées pour leur reconnaissance avec les TLR2 et TLR6 par ELISA. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type de DO_{490nm}.

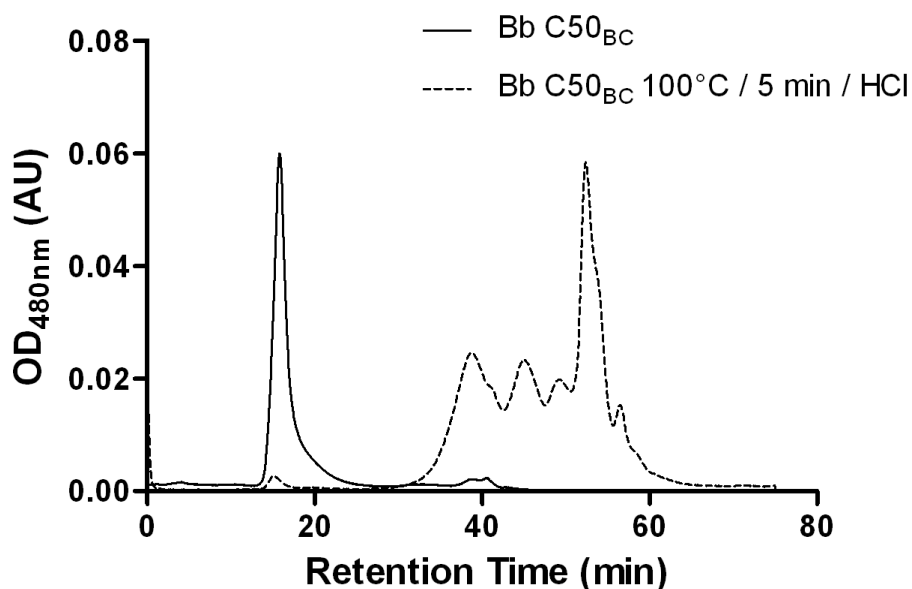


Fig. 8 : Gel filtration de Bb C50_{BC} natif et après hydrolyse acide à chaud. L'hydrolyse complète de Bb C50_{BC} a été effectuée à partir de 2mg de poudre lyophilisée/ml traité avec de l'acide chlorhydrique 5 min à 100°C. Le pic majeur à 16 min correspond à Bb C50_{BC} (composés de poids moléculaire > 600 kDa). Après hydrolyse (en pointillé), le pic exclu est presque totalement dégradé. Il est remplacé par au moins cinq pics élués à 38, 46, 49, 53 et 57 min (composés de poids moléculaire <67 kDa).

2.1.4.5 Composition en sucre de Bb C50_{BC} et liaison aux galectines

Les principaux glucides détectés par GC-FID dans un échantillon de 100 µg de Bb C50_{BC} lyophilisé sont le glucose (6,03µg) et le galactose (0,58µg) (Fig. 9a). L'analyse par GC/MS confirme que le glucose est le composant majoritaire (Fig. 9b). La co-élution du mannose avec le galactose dans le spectre de GC-FID rend difficile la quantification et permet uniquement d'estimer la teneur en mannose. L'analyse GC/MS confirme également la présence de mannose mais le galactose n'est plus détecté.

Toutefois, la quantification du mannose reste difficile car la forte concentration de glucose masque le signal. Le rhamnose et des sucres acétylés comme la N-acétylgalactosamine et la N-acétylglucosamine sont détectés à l'état de trace (respectivement 0,04 ; 0,07 et 0,1 µg). Pour interpréter correctement le spectre, l'échantillon de Bb C50_{BC} a été dilué au 1:5 mais mis à part le glucose, seuls des pentoses, de la N-acétylgalactosamine et de la N-acétylglucosamine sont encore détectés. Pour déterminer si des hexosamines et/ou du galactose sont localisés en surface de Bb C50_{BC}, la reconnaissance par les galectines 1 et 3 est quantifiée. Bb C50_{BC} est reconnu principalement par la galectine-1 (Gal-1) (Fig.10). La galectine-3 ne reconnaît que de façon négligeable le Bb C50_{BC}. Pour caractériser la force de la liaison des sucres, on applique plusieurs traitements physiques. Le Bb C50_{BC} est soumis à une première ultrafiltration (Fig.11). La reconnaissance par la Gal-1 est diminuée de moitié, ce qui indique que les agonistes de la Gal-1 sont faiblement associés au Bb C50_{BC}.

De plus, l'incubation à 75 °C de Bb C50_{BC} pendant 5 min entraîne la perte de près de 80% de la reconnaissance par la Gal-1, et de près de 95% lorsque Bb C50_{BC} est chauffé puis ultrafiltré sur une membrane de seuil de 50 kDa (Fig. 11). Enfin, la fraction de RP1 reconnue par les TLRs est testée pour sa liaison avec la Gal-1. La fraction RP1 est reconnue par la Gal-1 avec la même intensité que Bb C50_{BC} (pour 200 µg de protéines par puits, DO = 0,55 pour Bb C50_{BC} et 0,61 pour la fraction de RP1) (données non présentées).

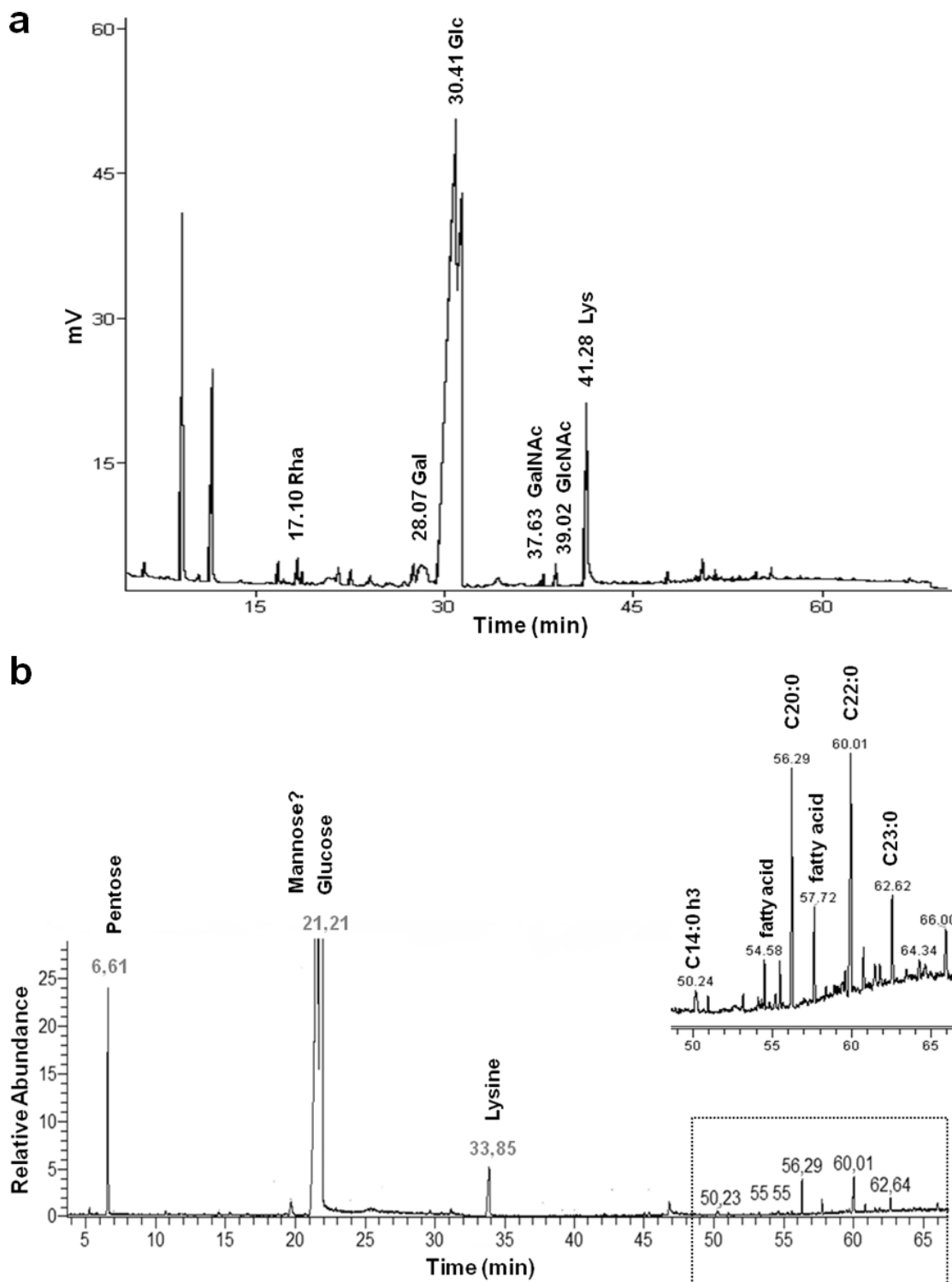


Fig. 9 : Analyses GC/FID et GC/MS-EI de Bb C50_{BC}. (a) Spectre GC/FID. Les pics identifiés correspondent au rhamnose (17,10 min), au galactose (28,07 min), au glucose (30,41 min), à la N-acétylgalactosamine (37,63 min), à la N-acétylglucosamine (39,02 min) et à la lysine utilisée comme étalon interne (41,28 min); (b) Spectre GC/MS-EI. L'encadré est un agrandissement du spectre des acides gras C14:0h3 (50,2 min), C20:0 (55,83min), C22:0 (56,29 min), C23:0 (62,62min). Les pics détectés aux temps de rétention 54,58 ; 55,55 et 57,72 min n'ont pas été identifiés.

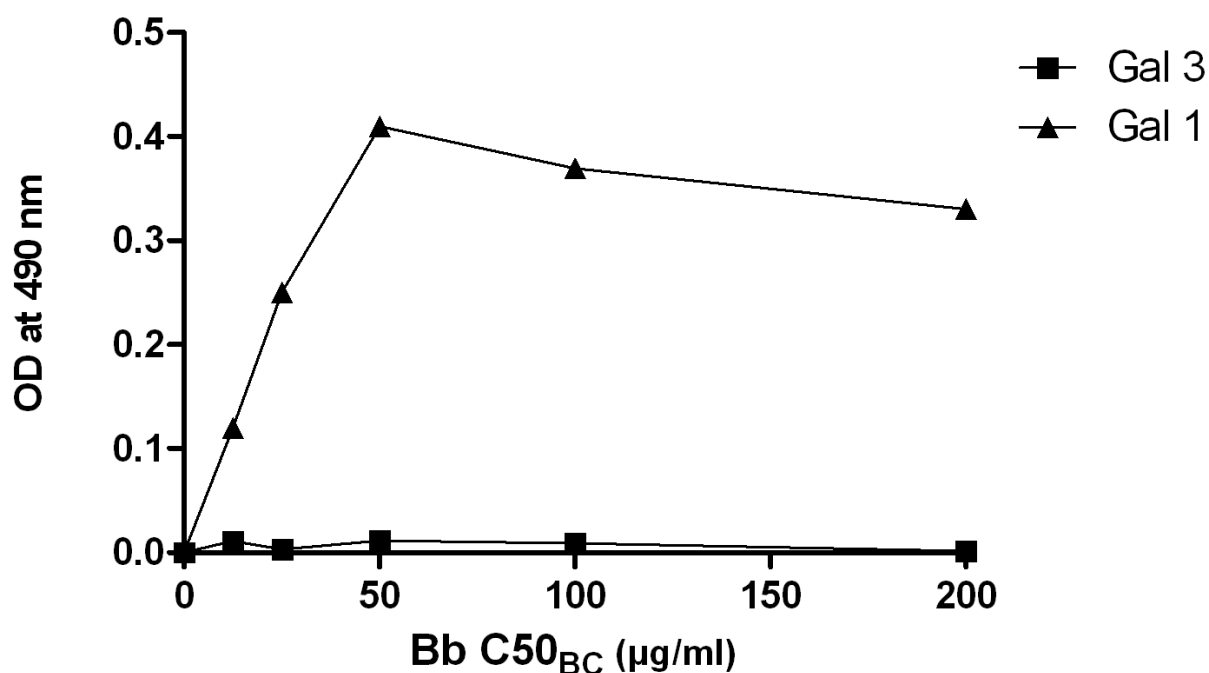


Fig. 10 : Reconnaissance de Bb C50_{BC} avec les galectines 1 et 3. La reconnaissance par la Gal-1 et la Gal-3 d'une gamme de 0 à 200µg de poudre lyophilisée de Bb C50_{BC} est quantifiée par technique ELISA. Aucune reconnaissance significative n'est observée avec le Gal-3. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type de DO_{490nm}.

2.1.4.6 Composition lipidique de BbC50_{BC}

Le spectre GC/MS de Bb C50_{BC} montre quelques pics correspondant à des acides gras (Fig. 10b). L'acide gras C14:0H3 (14,0 et h3 se réfèrent respectivement au nombre d'atomes total de carbone, à la double liaison et au groupement 3-hydroxy) pourrait provenir d'une contamination par du LPS. La concentration d'endotoxine dosable correspond à 0.05EU/µg de poudre lyophilisée de BbC50_{BC}. Les deux principaux pics correspondant à des acides gras C20:0 et C22:0 sont certainement plus spécifiques du Bb C50_{BC}.

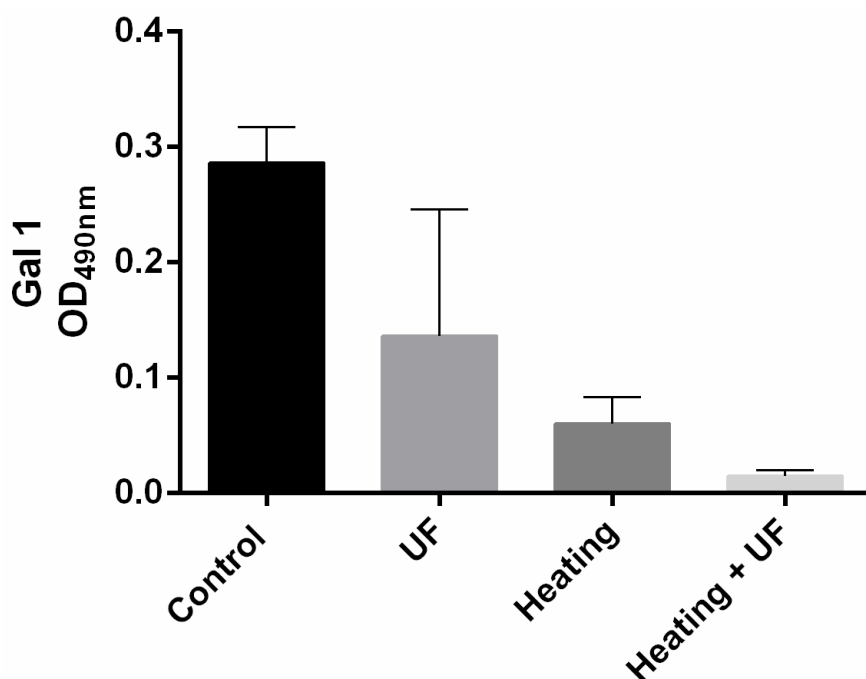


Fig. 11 : Reconnaissance de Bb C50_{BC} avec la Gal-1 après chauffage et ultrafiltration. La reconnaissance par la Gal-1 de 300µg de poudre lyophilisée de Bb C50_{BC} est quantifiée par ELISA après traitement. Control : Bb C50_{BC} non traité ; UF : BbC50_{BC} ultrafiltré sur une membrane 50kDa ; Heating : Bb C50_{BC} chauffé 75°C pendant 5min. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type de DO_{490nm}.

2.1.4.7 Analyse des protéines de Bb C50_{BC}

Les trois principaux peptides libérés après digestion trypsique de Bb C50_{BC}, sont séquencés (Tableau 3). La recherche de protéines dans les bases de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) montre des similitudes importantes entre les peptides issus de Bb C50_{BC} et une protéine sécrétée comprenant un domaine CHAP, ou une fonction amidase (Tableau 3). Par ailleurs, deux peptides de Bb C50_{BC} montrent d'importantes similitudes avec une protéine de liaison aux glucanes et un antigène de surface de *B.animalis* (Tableau 3). La région génomique de 1300 pb correspondant à une protéine hypothétique sécrétée par *B.breve* est amplifiée et séquencée. L'analyse de la séquence polypeptidique déduite confirme l'homologie observée avec la protéine de 45kDa comprenant un domaine CHAP.

Séquence peptidique	Description	Numéro d'accension	Identités	e-value
RELGIGTPSFLHNGGQWYIYA	Putative secreted protein with CHAP domain [<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 7019]	AHJ18787	21/21	5e-14
	Amidase [<i>Bifidobacterium breve</i>]	WP_003828479	21/21	5e-14
	Glucan-binding protein B [Bifidobacterium animalis subsp. animalis ATCC 25527]	YP_002967982	12/16	8e-06
	Surface antigen [Bifidobacterium animalis subsp. lactis BI-04]	YP_002967982	12/16	1e-04
RVLYNPGQYWYVH	Putative secreted protein with CHAP domain [<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 7019]	AHJ18787	13/13	2e-06
	Amidase [<i>Bifidobacterium breve</i>]	WP_003828479	13/13	2e-06
	Glucan-binding protein B [Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011]	YP_002469942	10/13	8e-05
	Surface antigen [Bifidobacterium animalis subsp. lactis BI-04]	YP_002967982	10/13	8e-05
EQATANGQVSSGQQSTGGSAAP	Putative secreted protein with CHAP domain [<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 7019]	AHJ18787	22/22	2e-11
	Amidase [<i>Bifidobacterium breve</i>]	WP_003828479	22/22	2e-11

Tableau 3: BLASTP des peptides de Bb C50_{BC} trouvés en spectrométrie de masse.

2.1.4.8 Prédiction bioinformatiques

La séquence polypeptidique déduite de Bb C50_{BC} commence en position N-terminale par un peptide signal de 45 acides aminés, correspondant à une hélice transmembranaire, et contient le motif lipobox (LAAC) dans la séquence du peptide signal MVWSIATERIYMTKAKTMRPVLAAC, avec la cystéine invariable en position 25 et deux résidus chargés positivement dans les 14 premiers résidus. Ce motif essentiel est indispensable pour la dérivation lipidique par thiocylation de la cystéine (Tableau 4).

Par analogie avec la protéine précurseur de la N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase sle1 (accès Swiss-Prot: P0C1U7), il est probable qu'entre les positions 44 et 451, les acides aminés sont exposés à l'extérieur de la membrane plasmique, localisés vraisemblablement dans la paroi cellulaire (Score=9.20 PsortB). La structure secondaire comprend 67,2% d'hélice alpha, 52,6% de feuillets beta (serveur CFSSP). La structure tertiaire est obtenue à partir de deux modèles qui couvrent environ 92% de la séquence d'acides aminés totale. La partie N-terminale de la lipoprotéine (entre les positions 28 et 304) est principalement composée d'hélices alpha et est très proche du modèle de la protéine transmembranaire de la colicine (97,5%), tandis que l'extrémité C-terminale est composée d'hélices alpha et de feuillets bêta et se rapproche du modèle CHAP (99,9%) (entre les positions 312 et 459) (Tableau 4).

Prédictions bioinformatiques	Position	Score*	Logiciel
Peptide signal	1- 45	0.713	SignalP 4.1
Localisation cellulaire	Cell wall	9.2	PSortB v3.0.2
Lipoprotéine signal	1-25		DOLOP
<i>Structure tertiaire</i>			
CHAP domain (N°Accession: c2k3aA)	312-459	99.9	Phyre 2.0
Colicin-transmembrane protein (N°Accession: c1ciiA)	28-304	97.5	Phyre 2.0

Tableau 4: Prédiction bioinformatiques à partir de la séquence d'acide aminée de Bb C50_{BC}.

2.1.5 Discussion

Les produits de fermentation (Bb C50_{SN}) de *Bifidobacterium breve* C50 induisent la maturation et la survie prolongée des cellules dendritiques ainsi qu'une production importante d'IL-10 par l'intermédiaire de la voie TLR2 (Hoarau et al., 2006). Dans ce travail, le dosage par technique ELISA confirme la présence d'agonistes des récepteurs TLR2 et TLR6 dans le Bb C50_{SN}. Les agonistes des TLRs correspondent à des composés de poids moléculaire supérieur à 200 kDa. La majorité de ces composés ont un poids moléculaire supérieur à 600 kDa (Bb C50_{BC}). Un traitement acide à chaud pendant 5 minutes suffit à dégrader complètement le Bb C50_{BC} ce qui évoque une structure des composés de poids moléculaire élevé sous forme d'agrégats combinant des sous-unités, plutôt qu'une structure macromoléculaire unique. Le nombre d'unités s'agrégeant semble être variable. La fraction RP1 étant reconnue par les anticorps anti-Bb C50_{BC}, les deux TLRs et la Gal-1, il est fort probable que les composés RP1 ne diffèrent de ceux de Bb C50_{BC} que par le nombre d'unités les constituant. L'hypothèse d'une agrégation d'unités est également confortée par le séquençage de la protéine Bb C50_{BC} qui conduit à l'identification d'une seule protéine bifide de 45kDa avec un domaine CHAP. Le domaine CHAP (cystéine, histidine dépendant amidohydrolases/peptidases) est une grande famille d'amidase principalement impliquée dans l'hydrolyse du peptidoglycane. Ces protéines ne sont pas caractérisées et pourraient être multifonctionnelles (Bateman & Rawlings, 2003). Ainsi, l'enzyme TgaA de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 est capable de moduler la maturation des cellules dendritiques par l'intermédiaire de son domaine CHAP (Guglielmetti et al., 2014). D'autres protéines de la superfamille CHAP agissent également comme des antigènes de surface indiquant qu'ils sont en partie localisés à l'extérieur de la paroi cellulaire (Fagan et al., 2001; Schubert et al., 2000). Enfin, le logiciel PsortB prédit une localisation dans la paroi cellulaire de la protéine de Bb

C50_{BC} (Fig. 12). Cette dernière étant récupérée dans le surnageant de culture exempt de cellules, la protéine est très probablement destinée à être sécrétée dans le milieu extracellulaire.

Un autre trait majeur de la protéine Bb C50_{BC} est la présence d'une lipobox. Il découle de l'analyse de la séquence d'acides aminés de Bb C50_{BC} par les outils bioinformatiques la prédiction d'une lipoprotéine comprenant une cystéine dans la région N-terminale avec présence d'une lipobox (LAAC). De plus, la présence dans la région N-terminal de deux résidus chargés positivement Lys ou Arg dans les 14 premiers résidus de la séquence de signaux (1-MVWSIATERIYMTKAKTMRPVLAAC-25) et d'une région intermédiaire composée de résidus hydrophobes non chargés d'une longueur de 7 acides aminés corroborent l'hypothèse d'une configuration de lipoprotéine (Braun, 1993). La structure lipoprotéique de Bb C50_{BC} est confortée par la détection d'acides gras par GC/MS. Les lipoprotéines bactériennes sont structurellement divisées en deux groupes: les formes diacylées et triacylées. La conversion de la forme diacylée à la forme triacylée est connue pour modifier la spécificité de liaison avec les TLRs, la forme diacylée étant majoritairement reconnue par l'hétérodimère TLR-2/6 alors que la forme triacylée répond avec le TLR-2/1 (Kurokawa et al., 2012). Comme Bb C50_{BC} se lie fortement au TLR6, il est hautement probable que la lipoprotéine Bb C50_{BC} soit sous forme diacylée (Nakao et al., 2005). Parmi les acides gras détectés, deux pics majeurs sont révélés : C20:0 et C22:0. Ces deux acides gras sont vraisemblablement liés à la fraction sulfhydryle de la cystéine conservée (située en position 25 de la région Nter) dans le peptide signal précurseur de la lipoprotéine bifide contenant un domaine CHAP.

La différence de liaison entre Bb C50_{BC} et RP1 avec les récepteurs TLR2 et TLR6 conforte également l'hypothèse que Bb C50_{BC} est un complexe composé de l'assemblage d'unités lipoprotéiques sous forme agrégée. La structure cristalline de complexe lipopeptidique TLR2-

TLR6-diacylées révèle que le canal de liaison TLR6-lipide est bloqué par deux phénylalanines qui entravent la liaison à toute autre chaîne d'acide gras. Les deux chaînes acyl-ester des lipopeptides diacylées sont donc insérées profondément dans le noyau hydrophobe du TLR2 (Ray et al., 2013). La faible reconnaissance de Bb C50_{BC} avec le TLR2 suggère que les chaînes acyl- sont partiellement masquées. Bb C50_{BC} est isolé à partir du surnageant de fermentation, qui, contrairement à la membrane hydrophobe est un environnement hydrophile. Ainsi, le poids moléculaire élevé de Bb C50_{BC} et sa faible reconnaissance avec le TLR2 implique que l'agrégat excrété dans le milieu extracellulaire présente sa séquence C-terminal hydrophile à l'extérieur de la structure, tandis que la structure N-terminal lipophile est principalement située à l'intérieur d'un noyau hydrophobe (Fig. 13).

Enfin, une deuxième protéine dont l'homologie avec la lipoprotéine est prédite par les outils bioinformatiques, est un récepteur de glucane de *B. animalis*. La concentration élevée en glucose détectée par GC-FID et GC/MS laisse présager que les fragments de glucanes pourraient être liés au récepteur des lipoprotéines. Il est probable que le polymère de glucose est produit au cours du processus de fermentation par le biais d'enzymes bifides. Parmi ces enzymes, la lactosidase a été antérieurement dosée en forte concentration dans le lactosérum de Bb C50 (Mullie et al., 2002). La fonction cellobiohydrolase de la lactosidase libérant du nitrophénol à partir du substrat 4-nitrophényl- β -lactoside permet d'envisager que le glucose est lié au groupement nitrophényle. A l'instar de la bêta-galactosidase, qui, en plus d'hydrolyser le lactose en glucose et galactose, catalyse également la réaction de transgalactosylation, la lactosidase bifide pourrait être impliquée dans un processus de transglycosylation (Hsu et al., 2005). Le lactose sert de donneur de résidu galactosyl et d'accepteur pour former des di-, tri-galacto-oligosaccharides (GOS), voire de degré de polymérisation supérieur au cours de la transglycosylation avec la galactosidase.

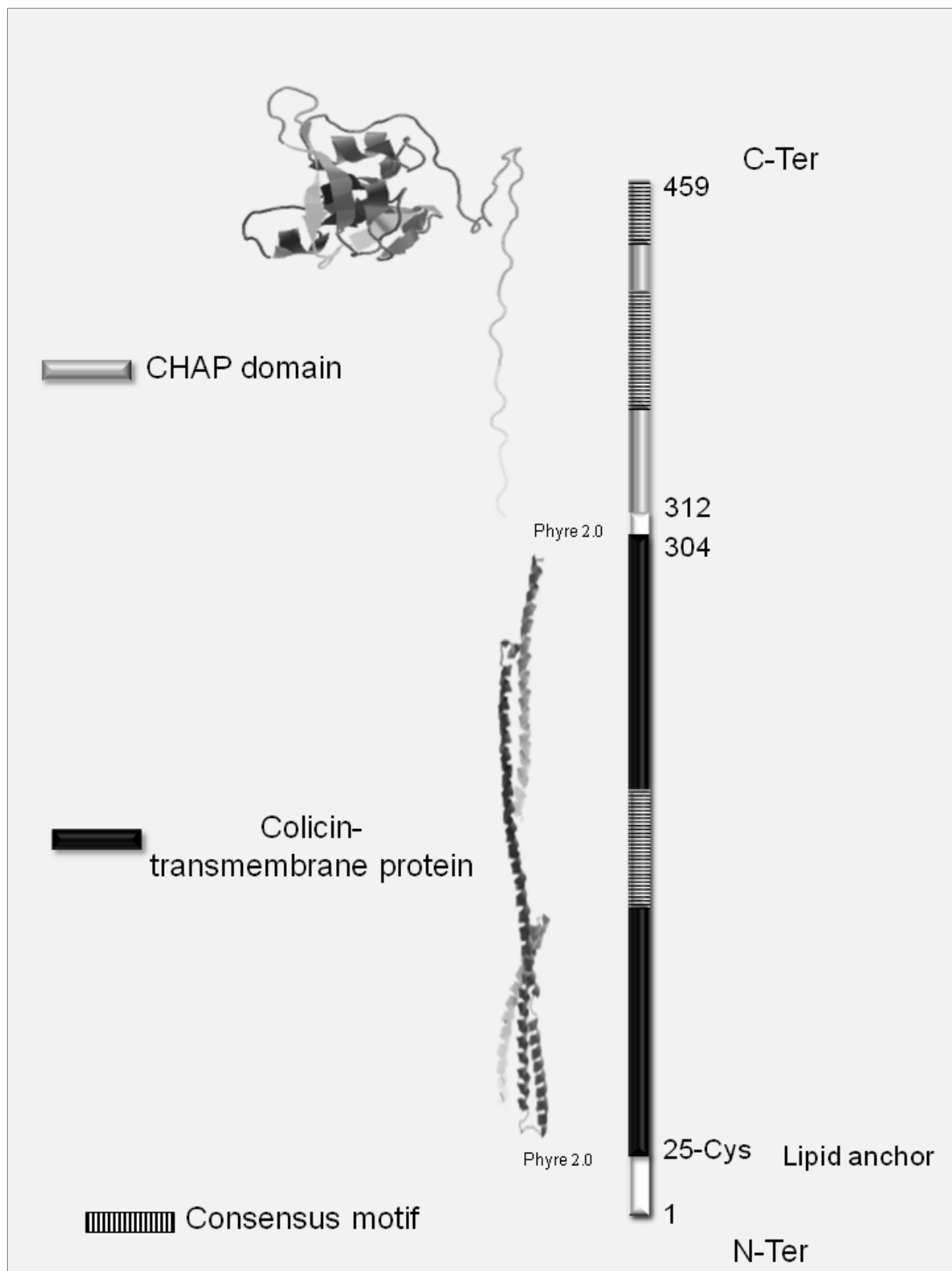


Fig. 12 : Modélisation de la structure protéique de Bb C50_{BC}. La structure tertiaire de Bb C50_{BC} a été prédite par Phyre 2.0. La cystéine de la lipobox est signalée par la mention “lipid anchor”. Les modèles protéiques « Colicin transmembrane » et “ CHAP domain ” partagent plus de 95% d’homologie avec Bb C50_{BC}. Les motifs consensus sont représentés en hachurés.

Au lieu d'ajouter des groupements galactose sur le lactose, les fragments de glucose pourraient être assemblés pour former des glucanes.

Bien que dominant, le glucose n'est pas le seul sucre présent dans Bb C50_{BC}. Mais à l'exception de mannose qui ne pouvait pas être quantifié, le galactose, les pentoses ou les hexosamines représentent entre 1:5ème et 1:60ème de la concentration en glucose. Du fait de leur facilité de détection dans les différents lots de Bb C50_{BC}, il est probable que ces sucres minoritaires soient associés à l'ensemble des lipoprotéines. Pour localiser les hexosamines et les groupements galactose sur le complexe, nous avons analysé la liaison de Bb C50_{BC} et de RP1 avec les galectines. La meilleure reconnaissance de Bb C50_{BC} et de RP1 est observée avec le récepteur Gal-1. En revanche, le Bb C50_{BC} montre une faible liaison avec Gal-3. La présence de résidus terminaux sont des N-acétyllactosamines (LacNAc) sont indispensable à l'interaction d'oligosaccharides avec la Gal-1 (Di Virgilio et al., 1999). La reconnaissance de Bb C50_{BC} avec la Gal-1 indique donc que les LacNAc sont exposées à l'extérieur du complexe bifide. Il est toutefois surprenant que le Bb C50_{BC} ne soit pas reconnu par la Gal-3. En effet, les spécificités de liaison glucidique entre la Gal-1 et la Gal-3 sont similaires et elles se lient aux LacNAc et aux résidus de lactose (Barondes et al., 1994; Gabius, 1997; Kasai & Hirabayashi, 1996). Cependant, des différences existent. Contrairement à la Gal-3, la Gal-1 a besoin de la présence d'unités LacNAc terminales pour la reconnaissance de poly (LacNAc) (Hirabayashi et al., 2002; Stowell et al., 2008). En revanche, la Gal-3 reconnaît des LacNAc internes. Par ailleurs, la Gal-3 se lie faiblement aux structures composées de noyau O-glycane contenant une unité LacNAc terminale et aux structures composées de N-glycane bi-antenné (LacNAc2 NG), alors que celles-ci possèdent une forte liaison avec la Gal-1 (Hirabayashi et al., 2002). Cependant, les agonistes de la Gal-1 sont faiblement liés au Bb C50_{BC} puisque une simple ultrafiltration avec un seuil de coupure de 50 kDa suffit à réduire de moitié l'intensité de liaison avec la Gal-1. Le chauffage à 75 °C pendant 5 min conduit également à une perte

de reconnaissance de 80%. En revanche, la faible liaison des agonistes de la Gal-1 n'empêche pas la reconnaissance de Bb C50_{BC} et RP1 avec les TLRs.

En conclusion, nous avons montré que les composés bifides de Bb C50_{SN}, supportant l'activation des cellules dendritiques via le TLR2, sont des agrégats de poids moléculaire supérieur à 200kDa associant des lipoprotéines et des sucres, principalement de glucose, et vraisemblablement couvertes par des oligosaccharides contenant des hexosamines.

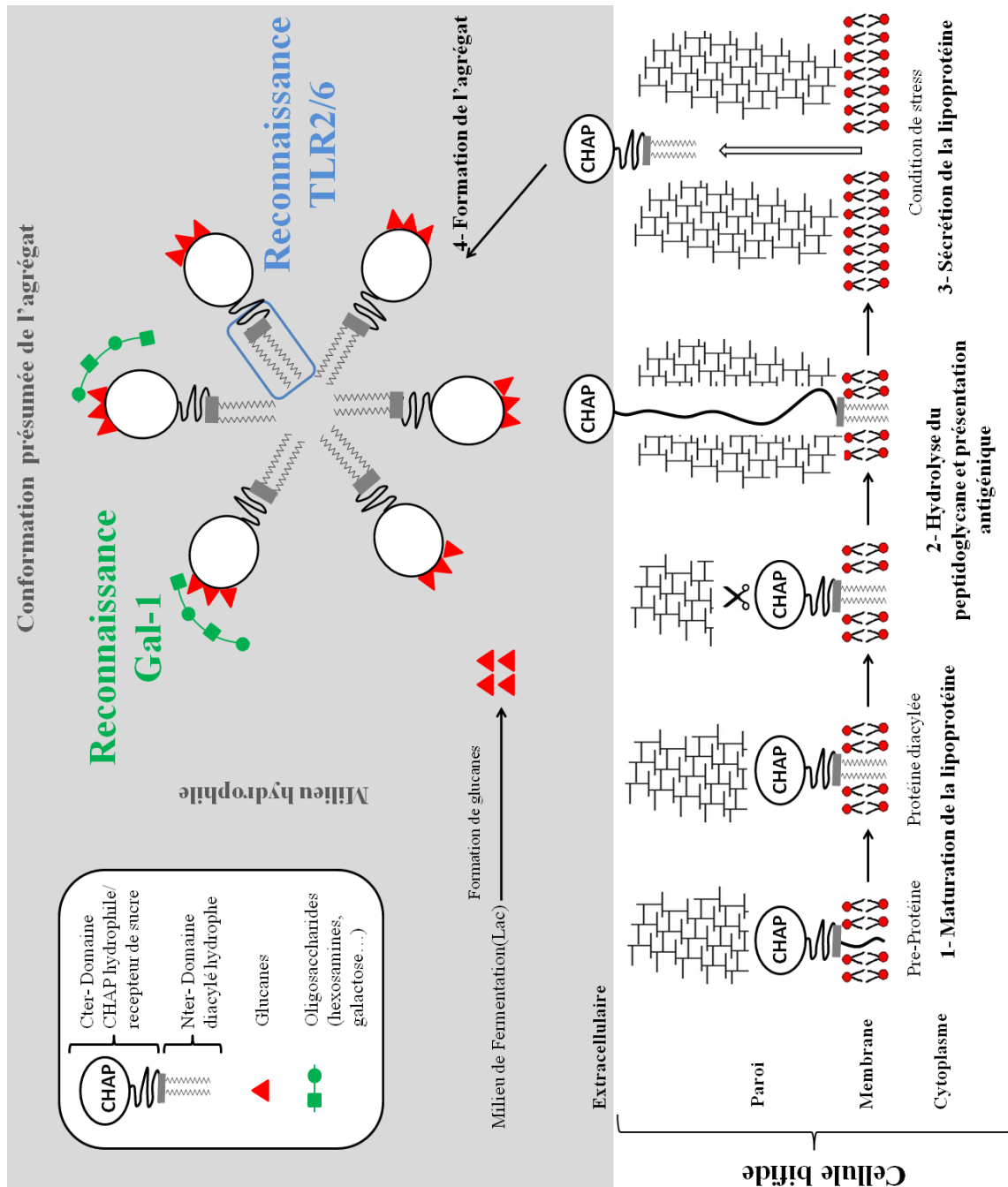


Fig. 13 : Représentation schématique de la sécrétion du complexe Bb C50_{BC} sous forme agrégée dans le milieu extracellulaire. Dans un premier temps, la protéine attachée à la membrane plasmique subie des étapes de maturation au cours de laquelle deux acides gras lui sont greffés au niveau de la cystéine. Puis, une fois mature la lipoprotéine devient fonctionnelle et le domaine CHAP peut hydrolyser le peptidoglycane puis se positionner en antigène de surface. En condition de stress (pH...), la lipoprotéine est excrétée dans le milieu extracellulaire hydrophile. BbC50_{BC} pourraient alors s'organiser en micelles avec les structures hydrophiles composées de la partie C-Ter de la protéine et des sucres à l'extérieur et les structures hydrophobes composées de la partie N-Ter de la protéine et des lipides à l'intérieur. Le complexe est constitué de 4 à 6 structures lipoprotéines associées à des sucres.

2.2 Recherche de lipoprotéines avec un domaine CHAP chez d'autres bifidobactéries

Cette partie fait l'objet d'un article scientifique soumis au journal « Biochimie » le 28 avril 2015. : **Scuotto A**, Romond PC, Djorie S, Alric M, Romond MB « Mining for lipoprotein with CHAP domain secreted by bifidobacteria ».

2.2.1 Résumé (Fig.14)

B.breve C50 sécrète une lipoprotéine associée avec du glucose, agissant sous une forme agrégée comme agoniste des récepteurs TLR2/TLR6. L'objectif de cette étude était de vérifier si d'autres bifidobactéries peuvent sécréter des lipoprotéines similaires. L'analyse *in silico* désigne l'espèce *B.longum* comme candidate la plus probable. Deux souches sur 5 poussent dans le milieu de production. Elles sécrètent des agrégats avec un rendement de production dépendant de la souche. L'analyse MS révèle des peptides présentant une forte homologie avec une protéine comprenant un domaine CHAP. La structure sous forme lipoprotéique est confortée par la détection de lipides avec une prédominance d'acides gras C16: 0 et C18: 0. Contrairement à la *B.breve* C50, les agrégats issus de la souche *B.longum* CBi0703 ne sont pas capables de se lier au TLR6. En revanche, comme pour *B.breve*, les principaux sucres détectés (glucose et mannose) sont de probables ligands des lipoprotéines. La liaison à la galectine-1 indique que les hexosamines et le galactose se situent en périphérie des agrégats. En conclusion, comme *B.breve*, l'espèce *B.longum* partagent la capacité de sécréter des agrégats composés d'unités lipoprotéiques en association avec des sucres reconnus par la galectine-1 mais dépourvu de la capacité de liaison au TLR6.

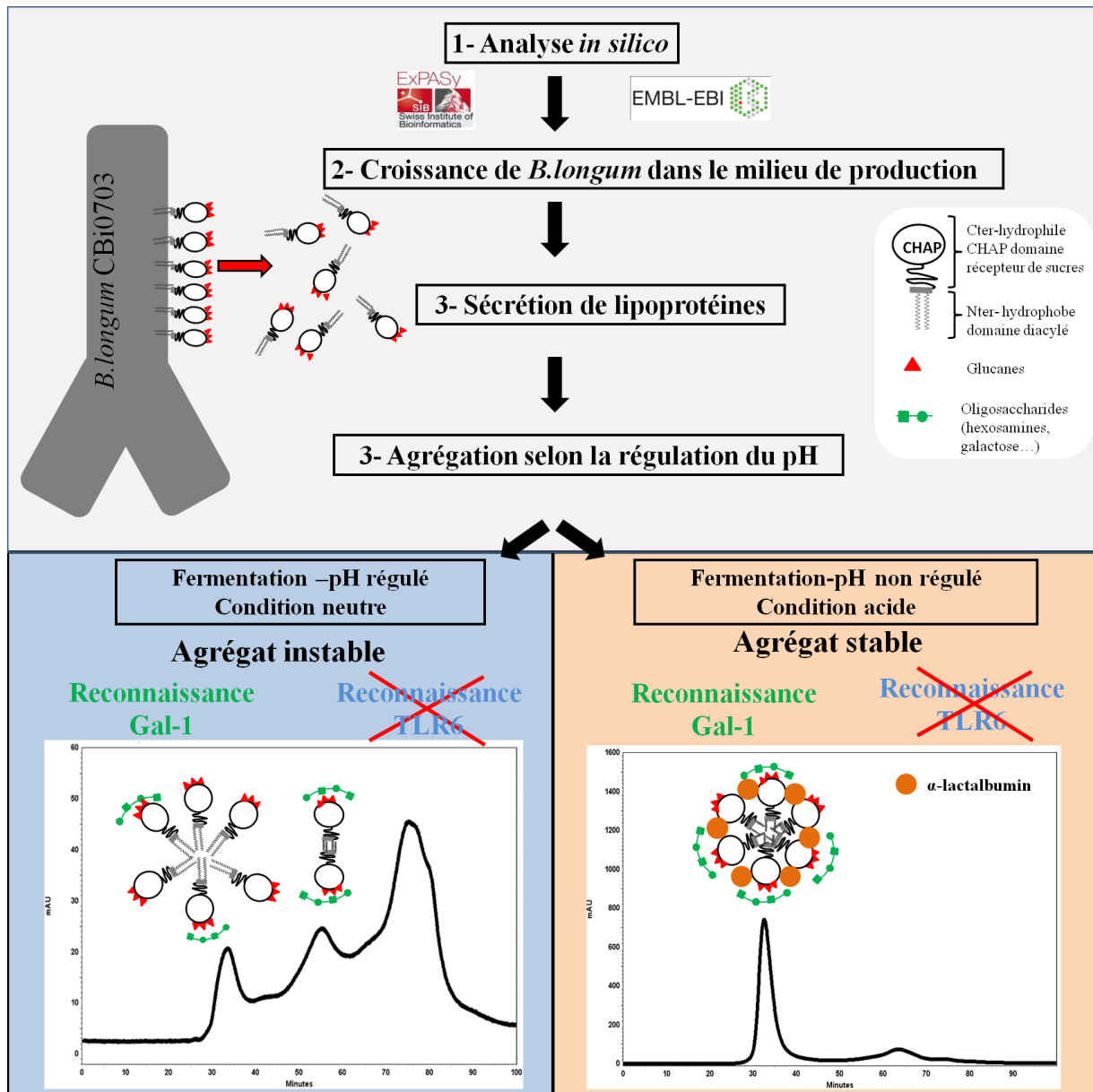


Fig. 14 : Résumé graphique. L'analyse *in silico* désigne l'espèce *B. longum* comme candidate la plus probable. Seules deux souches de *B. longum* sont capables de pousser sur le milieu de production. La souche *B. longum* CBi0703 sécrète des lipoprotéines associées à des sucres sous forme agrégée dans le milieu. L'agrégation de ces composés est sous l'influence du pH. A un pH proche de la neutralité, la structure de ces composés sécrétés est instable. En revanche, à pH acide les composés sécrétés sont plus stable et stabilisés par l'agrégation de l'alpha lactalbumine. Quelque soient les conditions fermentaires, ces composés conservent leur capacité de liaison à la galectine 1 mais contrairement à ceux de *B. breve* C50 ils ne sont plus reconnus par le TLR6.

2.2.2 Introduction

Il existe un faisceau d'indices étayant une interaction directe entre les protéines extracellulaires bactériennes de bactéries commensales et d'espèces pathogènes et le système immunitaire humain. Les protéines extracellulaires sécrétées par les bactéries probiotiques sont capables d'interagir avec l'hôte, initiant des réponses par les cellules mucosales. (Sanchez et al., 2010). Parmi les protéines extracellulaires sécrétées par les bifidobactéries, la serpine de *Bifidobacterium longum subsp.longum* NCC2705 inhibe efficacement les élastases neutrophiles pancréatiques (Ivanov et al., 2006). Les neutrophiles sont recrutés dans la muqueuse intestinale par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines inflammatoires dans la circulation sanguine et participent à des épisodes inflammatoires. La serpine agissant directement sur les enzymes impliquées dans la réponse inflammatoire, serait susceptible de jouer un rôle dans certains effets anti-inflammatoires des bifidobactéries (Ivanov et al., 2006). Ainsi, chez des souris déficientes en IL-10 nourries avec des protéines extracellulaires sécrétées par *B.longum subsp.infantis*, on observe une atténuation de l'inflammation et de la perméabilité au niveau du colon ainsi qu'une amélioration de la fonction barrière des cellules épithéliales (Ewaschuk et al., 2008).

Par ailleurs, les bifidobactéries sont capables d'inhiber la production du TNF- α (facteur de nécrose tumorale) et d'interleukine 6 (IL-6) induite par des lactobacilles immunostimulants dans les cellules immunitaires du sang *via* l'interaction avec le TLR2 (Zeuthen et al., 2008). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires conservés au cours de l'évolution et capables de reconnaître des motifs moléculaires. Ils représentent les principaux éléments déclencheurs de l'immunité innée. Les TLRs sont constitutivement exprimés sur les monocytes, macrophages, cellules dendritiques (CD) et les cellules épithéliales intestinales (IECs) (Abreu et al., 2005; Qian & Cao, 2013). D'autre part, nous avons montré

précédemment que les composés de haut poids moléculaires de Bb C50_{SN} pouvant induire la maturation, la production élevée d'IL-10 et la survie prolongée des cellules dendritiques par l'intermédiaire de la voie du TLR2 (Hoarau et al., 2006; Hoarau et al., 2008) sont constitués d'agrégats de poids moléculaire supérieur à 200kDa associant des lipoprotéines contenant un domaine CHAP et des sucres capables de lier le TLR2/TLR6 (Scuotto et al., 2014).

L'objectif de cette étude est de déterminer si des bifidobactéries appartenant à d'autres espèces sont capables de sécréter des lipoprotéines similaires et de former des agrégats de haut poids moléculaire. La sélection des espèces de bifidobactéries potentiellement intéressantes est réalisée par une analyse *in-silico* recherchant la présence de lipobox et l'homologie de leurs séquences protéiques. Une série de souches de *B.longum* présentant la séquence la plus proche et une lipobox, ont été cultivées dans le milieu de production utilisée pour la souche *B.breve* C50. La sélection finale repose sur l'adaptation de la souche sélectionnée au milieu de culture et sa capacité de croissance, ainsi que son rendement de production en composés de poids moléculaire élevé. Les composés de haut poids moléculaire sécrétés par la souche sont isolés par chromatographie de gel filtration et caractérisés par spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse. Leurs reconnaissances avec les TLRs et la galectine sont testées par technique ELISA. La séquence de la protéine est déduite de la séquence d'ADN après séquençage. Enfin, la protéine recombinante associée aux complexes est synthétisée par génie génétique et des anticorps polyclonaux dirigés contre celle-ci sont produits et purifiés. L'antisérum sert à détecter la protéine au sein des composés de haut poids moléculaire.

2.2.3 Matériels et Méthodes

2.2.3.1 Analyse *in-silico*

La séquence protéique de la lipoprotéine de *B.breve* C50 sert de référence pour les recherches de similitude par BLAST au sein de la base de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'analyse de séquence est réalisée en utilisant DNASTAR EditSeq, Carte Draw et MegAlign. Les alignements et les recherches de motifs spécifiques sont effectués à partir du site Web EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>). Les zones d'hydrophobie sont déterminées en utilisant le logiciel Expasy (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl>). La prédiction des régions transmembranaires dans les séquences de protéines est effectuée à l'aide du logiciel Predict (http://www.ch.embnnet.org/software/TMPRED_form.html). Trois programmes de prédiction différents sont utilisés pour détecter les peptides « signal » des lipoprotéines et le motif conservé contenant la zone "lipobox" caractéristiques des précurseurs de lipoprotéines bactériennes. Les outils bioinformatiques sont LipoP 1.0 serveur (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>), DOLOP (www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/) et PROSITE (www.expasy.org/PROSITE/).

2.2.3.2 Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches de *B.longum* utilisées dans cette étude sont: la souche type (DSM 20088T), PRSF B-028, B-085, B-086 (obtenues dans le cadre du projet européen « Biosafety Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria Used for Human Consumption »), CBi0701 and CBi0703 (issues de la collection Bifinove, Lille, France) (Klare et al., 2007). Elles sont cultivées dans le milieu Rosenow (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) à 37°C en condition anaérobie (Romond et al., 2009), puis adaptées au lactose par trois repiquages dans un bouillon contenant 15g/L de trypticase-peptone, 5g/L de lactose, 5g/L NaCl, 3g/L d'extrait de levure,

2g/L d'hydrolysats de lactalbumine, 3g/L de KH_2PO_4 , 3/84g.L de K_2HPO_4 , 0,3g/L d'acide ascorbique, 0,5g/L de MgSO_4 , 0,09g/L de MnSO_4 et 0,04g/L de MnSO_4 . Le milieu de production précédemment décrit pour permettre la sécrétion des lipoprotéines est composé de 70g/L de lactose 10g/L de protéines de lait hydrolysées et 0,03g/L de chlorhydrate de cystéine (Scuotto et al., 2014). Après inoculation, ce milieu est incubé à 37°C pendant 48h en condition anaérobie. Dans un essai supplémentaire le pH est régulé à 6,8 pendant la fermentation.

2.2.3.3 Isolement des composés bifides

Après la fermentation dans le milieu de production, le surnageant de culture est recueilli après centrifugation à grande vitesse, concentré par ultrafiltration (100 kDa) puis dialysé à l'aide d'une membrane de 10 kDa pour isoler les composés de haut poids moléculaire. Le surnageant concentré, appelé BI CBI0703_{SN} ou BI CBI0701_{SN}, est lyophilisé avant d'être soumis à analyse par chromatographie de gel filtration (GF) sur gel de Superdex200[®] (Sigma-Aldrich, St.Quentin Fallavier, France) (Annexe I). Les BCs et, dans certaines expériences, la fraction comme le pic retenu 1 (P1) sont collectés et lyophilisés avant analyse ultérieure (Annexe I). La teneur en protéine est estimée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). L'hydrolyse des différents pics et fractions est réalisée à 100°C en présence d'acide chlorhydrique (0,6M) et les composés libérés sont analysés par chromatographie GF.

2.2.3.4 Dosages par technique ELISA

Des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine recombinante BLIF sont développés chez le lapin (Proteogenix, France). Les poudres lyophilisées des BCs et leurs fractions diluées dans du tampon carbonate (0,05 M pH 9,6) sont adsorbées pendant une nuit sur le plastique des puits de microplaques (Corning [®] 96 et EIA / RIA) à 4 °C. Après 5 lavages avec

du tampon PBS (10 mM de PBS - 0,05% de Tween 20) suivis d'une incubation en présence d'une solution de saturation (10 mM de PBS - 0,5% de Tween 20 à 2% de BSA), le récepteur TLR6 recombinant de souris (R & D Systems) ou les anti-BLIF sont ajoutés dans les puits. La révélation est effectuée par incubation à 37 °C pendant 1 h avec des anticorps monoclonaux anti-IgG biotinylés (Sigma Aldrich) suivie d'une incubation en présence de Streptavidin-peroxydase (Sigma Aldrich) et d'OPD SIGMAFAST™ (Sigma Aldrich). La réaction est arrêtée par ajout de 50 µl par puits d'acide sulfurique (0,5 M). La densité optique (DO) est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan®EX-ThermoScientific).

La galectine 1 (13 nM) (R & D Systems) est utilisée à la place du TLR6 pour localiser les hexosamines et les groupements galactose sur les composés, et la reconnaissance est révélée à l'aide d'anticorps biotinylés anti-Gal-1 (R & D Systems).

2.2.3.5 Analyse de la protéine

La protéine est détectée dans les échantillons par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 10% en milieu SDS (Laemmli et al., 1970) après coloration au bleu de Coomassie et à l'argent. Les spots protéiques sont excisés et soumis à une digestion *in situ* à 37°C par de la trypsine (4ng/µl - Sequencing grade de modification de la trypsine, V511A, Promega) pendant une nuit. Le surnageant est mélangé avec de la matrice MALDI (comprenant de l'acide α -cyano-4-hydroxycinamic) et déposé sur une plaque MALDI MTB AnchorChip™ 600/384 (Bruker Daltonics). Les masses peptidiques sont déterminées à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF/TOF (Ultraflex II, Bruker). La calibration est effectuée à l'aide de la masse interne de la lysine. On recherche ensuite les concordances entre les masses peptidiques et les masses théoriques de toutes les protéines des

bifidobactéries de la base de données du NCBI, en utilisant le logiciel Mascot. Le BLAST du NCBI est utilisé pour rechercher les similitudes avec les peptides bactériens.

2.2.3.6 Extraction d'ADN et amplifications

L'ADN bactérien total de la souche BI CBI0703 est extrait comme décrit précédemment (Scuotto et al., 2014). Les amorces utilisées pour le séquençage ou pour l'analyse transcriptomique sont synthétisées par Eurogentec (Angers, France) (Tableau 5). Les amplifications géniques sont réalisées à l'aide du Taq PCR mastermix (Qiagen, Courtaboeuf, France) et les amplicons sont purifiés à l'aide du kit Qiagen PCR Purification. Le séquençage est effectué par Genoscreen (Lille, France).

L'expression des gènes est étudiée à différents temps lors de la fermentation. Pour ce faire, l'ARN bactérien est stabilisé dans les prélèvements avec du réactif RNA protect Bacteria (Qiagen) selon les instructions du fournisseur avant d'être congelé à -80°C. Après décongélation, les bactéries sont incubées avec du lysozyme (Sigma Aldrich) et de la protéinase K (Qiagen), dilués dans du tampon TE (Tris-HCl 30mM, EDTA 1mM, pH 8), avant extraction des ARN par le kit RNeasy Mini (Qiagen). Pour éliminer l'ADN résiduel, les échantillons sont traités par de la DNase à l'aide du RNase-Free DNase Set (Qiagen). La rétrotranscription et l'amplification des ADN complémentaires sont réalisées à l'aide du kit One step MESA GREEN qRT-PCR MasterMix Plus for SYBR® (Eurogentec) en utilisant le thermocycleur Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Montesson, France). Le mélange réactionnel contient dans un volume final de 25µl : 12,5µL de MIX de tampon de réaction 2X, 0,125µl d'EuroScript RT et d'inhibiteurs de RNase, 0,375µl d'eau RNase free, 2,5µl de chaque amorce (GAPDH: 250nM, BL1181:75nM, DNAPolIII: 250nM) et 7µl d'ARN. Les réactions de rétrotranscription/ amplification suivent le protocole :

- 1) étape initiale de synthèse de l'ADNc à 48°C pendant 30 min, activation de la Meteor Taq / inactivation de l'Euro Script à 95°C pendant 5min.
- 2) 40 cycles associant une étape de dénaturation à 95°C pendant 20s, une étape d'hybridation des amorces à 63°C pendant 20s et une étape d'extension à 72°C pendant 30sec.

Séquence (5'-3')	Gène cible	Taille de l'amplicon (pb)
Amorces Séquençage		
Forward longsmB74sens: CGCTTGTCGAATTCCTTCTT Reverse BL1181'rev: AGTTCCAGAAGGAGCAGCAG	CHAP Domain / SsrA binding protein	1063
Forward interBLftsXfwd: CGCTTGTCGAATTCCTTCTT Reverse interBLftsXrv: GGTGGTGGTCGCCATCCTGC	Cell division protein ftsX/CHAP domain	941
Forward longumGOIfw: CGTGGGCAACTCGTGGG Reverse BL1181qanti: GCAGACACCTATTCCGACCT	CHAP Domain	1394
Amorces Transcriptome		
BL1181qsens: CCAGCTGCTGCTTGAGTTC BL1181qanti: GCAGACACCTATTCCGACCT	CHAP domain	84
GAPDHfwd : GAGAAGGACGCCAACAACAT GAPDHrev : GTTGATGTGAGCCTGGGACT	GAPDH	108
DNApolalphaFWD : CGGCAAACCCGCCATCGACT DNApolalphaREV : CCGAGCGTGTCTCCTCGGGA	DNA polymerase III subunit alpha	84

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisées dans cette étude.

2.2.3.7 Analyse des sucres et des lipides

La composition en lipides et en sucres de BI CBI0703_{BC} est analysée par chromatographie phase gazeuse et par GC/MS EI comme décrit précédemment (Scuotto et al., 2014).

2.2.4 Résultats et discussion

2.2.4.1 Les séquences les plus proches de *B.breve* C50 appartiennent à *B.longum*

Parmi les souches de *B.breve*, les séquences protéiques sont très conservées avec presque 99% de similarité avec la lipoprotéine de *B.breve* C50 (N° d'accension GenBank : KJ847053) (Tableau 6). Les quelques différences observables sur la partie C-Terminal de la séquence ne modifient pas la charge ou l'hydrophobicité de la protéine, hormis la substitution de la glycine en position 453 par une asparagine.

Parmi les autres bifidobactéries, les protéines avec les séquences les plus proches appartiennent à l'espèce *B.longum* suivie par *B.pseudocatenulatum/catenulatum*, et *B.gallicum* (Tableau 6).

Les souches humaines *B.bifidum* et *B.adolescentis* possèdent des protéines montrant, respectivement, seulement 39 à 41% et 43% d'identité avec la séquence protéique de *B.breve* C50. En revanche, la séquence protéique de la souche murine *B.animalis* partage près de 60% d'identité avec la séquence protéine de la lipoprotéine de *B.breve* C50. La recherche de lipobox dans les séquences protéiques du genre *Bifidobacterium* (montrant une identité >50% entre les protéines) donne des résultats positifs pour toutes les espèces exceptées *B.gallicum* (Tableau 6). D'autre part, une lipobox (-ASAMF-) a été prédite chez une seule souche de *B.adolescentis* (L2-32) et aucune chez les souches de *B.bifidum*. Pourtant, une lipoprotéine appelée BopA a été décrite chez *B.bifidum* (Guglielmetti et al., 2008). Elle pourrait jouer un

rôle dans l'adhésion mais il n'est pas sûr qu'elle soit sécrétée hors de la bactérie (Gleinser et al., 2012; Guglielmetti et al., 2014; Kainulainen et al., 2013)

Comme les séquences protéiques de *B.longum* sont les plus proches de celle de *B.breve* C50, leur peptide signal et leur domaine CHAP ont été analysés. Le peptide signal de *B.longum* est très conservé avec une seule cystéine détectée (Fig. 15). Le motif lipobox de *B.longum* est aligné avec le motif -SAIC- de *B.breve* C50 alors que le motif -LAAC- était prédit comme lipobox par DOLOP. La recherche de lipobox, en utilisant la séquence courte de *B.breve* C50 s'alignant avec la séquence *B.longum* (démunie des 11 premiers acides aminés), est positive avec le logiciel LipoP (Score = 6.25004). Les séquences protéiques du domaine CHAP de *B.longum* sont moins conservées que le peptide signal et varient en terme de charge et d'hydrophobicité (Fig. S1).

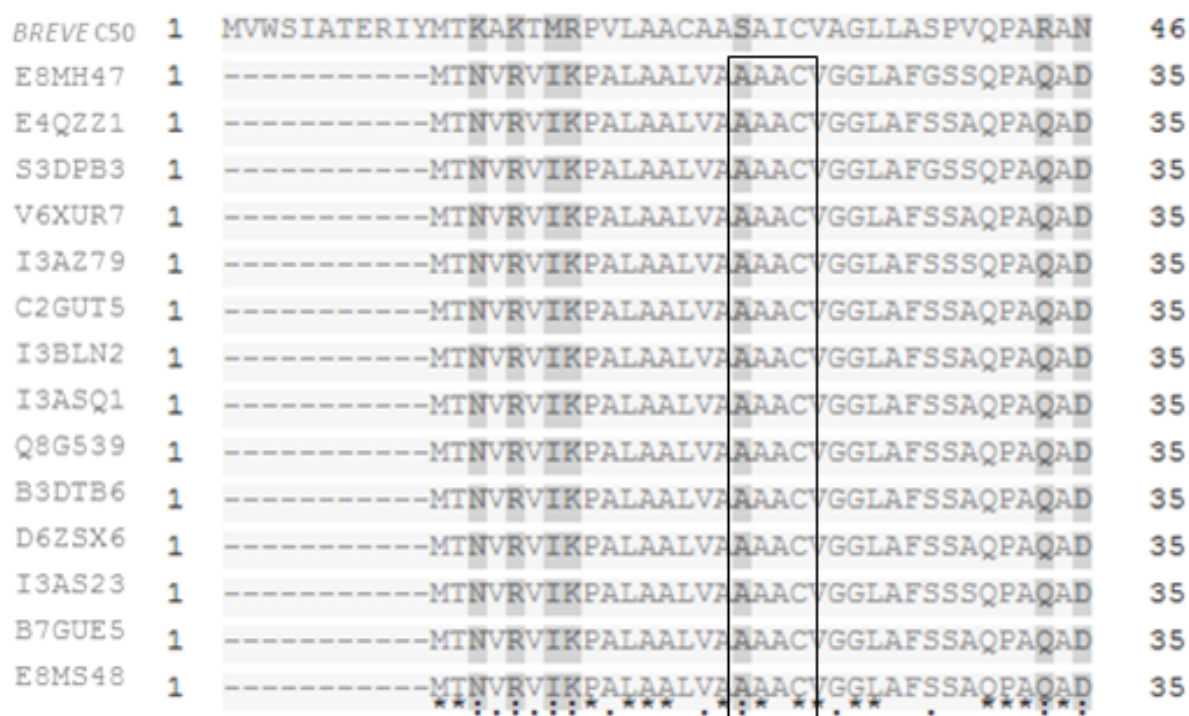


Fig. 15 : Alignement des séquences “peptide signal” des souches *B.longum* par rapport à la souche *B.breve* C50. Le motif lipobox -AAAC- (encadré en noir) est hautement conserve avec une seule cystéine chez les souches de *B.longum*.

	Souches	N° accession (TrEMBL)	% Identité avec <i>B.breve</i> C50	Programmes de prédiction de lipoprotéines:			Peptide signal ^a
				PROSITE	DOLOP	LipoP	
<i>B.breve</i>	C50	-	100	-	+	-	MVWSIATERIYMTKAKTMRPVLAAC
	JCP7499	U2E585	99	-	+	-	MVWSIATERIYMTKAKTMRPVLAAC
	CECT7263	H3L1P3	99	-	+	-	MVWSIATERIYMTKAKTMRPVLAAC
	DSM20213	D4BMX4	99	-	+	-	MVWSIATERIYMTKAKTMRPVLAAC
<i>B.longum</i>	JCM 1217	E8MH47	71	5.0	-	12.3966	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	BBMN68	E4QZZ1	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	D2957	S3DPB3	71	5.0	-	12.3966	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	E18	V6XUR7	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	2-2B	I3AZ79	71	5.0	-	12.6989	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	ATCC 55813	C2GUT5	70	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	44B	I3BLN2	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	1-6B	I3ASQ1	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	NCC 2705	Q8G539	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	DJO10A	B3DTB6	70	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	JDM301	D6ZSX6	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	35B	I3AS23	71	5.0	-	12.6989	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	ATCC 15697	B7GUE5	71	5.0	-	13.2169	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	157F	E8MS48	71	5.0	-	13.5004	MTNVRVIKPALAALVAAAAC
	DSM 20438	C0BPZ6	65	-	-	9.99138	MTSKKALKPAVAVFATGALC
	IPLA36007	A0A072MTR7	65	-	-	9.99138	MTSKKALKPAVAVFATGALC
	DSM 16992	B6XVX2	63	5.0	-	7.32062	MISKKALKPAAAVFATGAMC
<i>B.pseudocatenulatum</i>	DSM 20093	D1NUT8	63	-	-	-	
<i>B.catenulatum</i>	BLC1	G2SV08	60	-	-	8.09358	MTNRKRTVPVVASSLASVLC
<i>B.gallicum</i>	BI 12	S0A4V2	60	-	-	8.09358	MTNRKRTVPVVASSLASVLC
<i>B.animalis</i>	CNCM-I2494	G0H9G4	59	-	-	-	

^aLes motifs lipobox prédits sont en gras.

Tableau 6: Analyse *in-silico* des séquences protéiques des espèces du genre *Bifidobacterium*.

2.2.4.2 La sécrétion des composés bifides de haut poids moléculaire (BC) diffère selon les souches de *B.longum*

Pour apporter la preuve que *B.longum* sécrète des agrégats, plusieurs souches de *B.longum* sont cultivées dans le bouillon d'adaptation au lactose contenant 5g/l de lactose avant d'être inoculées dans le bouillon de production. Dans ce dernier milieu, seulement deux souches (CBi0701 and 0703) sont capables de pousser mais avec des cinétiques de croissance différentes (croissance bactérienne plus lente pour la souche CBi0703 que pour la CBi0701) (Fig. S2A). La baisse du pH pendant la fermentation de la souche CBi0703 est également plus lente (Fig. S2B). En revanche, la régulation du pH à 6,8 favorise la croissance de la souche (Fig. S2).

La comparaison des profils de GF des surnageants concentrés montre une concentration plus importante en composés du pic exclu (au dessus de 600kDa) dans le surnageant de Bl CBi0703_{SN} (moyenne : $86 \pm 2.8\%$ de pic exclu=EP) par rapport au surnageant de Bl CBi0701_{SN} (moyenne: 21% EP) ainsi qu'une hauteur de pic plus élevée (Fig. 16). Il en résulte que une production de composés de haut poids moléculaire dans le milieu estimée à 145 mg de CBi0703_{BC}/l contre 28 mg de CBi0701_{BC} /l. A pH régulé, la concentration de CBi0703_{BC} est autour de 179 mg/L.

Bien que la plupart des souches de *B.longum* poussent très difficilement dans le milieu de production, au moins deux souches isolées de bébés sont capables de sécréter des composés de haut poids moléculaire. Cependant, le rendement de composés sécrétés n'est pas lié aux capacités de croissance des souches. Par ailleurs, le pic exclu correspondant aux composés de haut poids moléculaire est presque le seul détecté sur le profil GF du surnageant issue de la fermentation non régulée ce qui contraste avec le profil plus complexe du surnageant concentré de *B.breve* C50 (Scuotto et al., 2014).

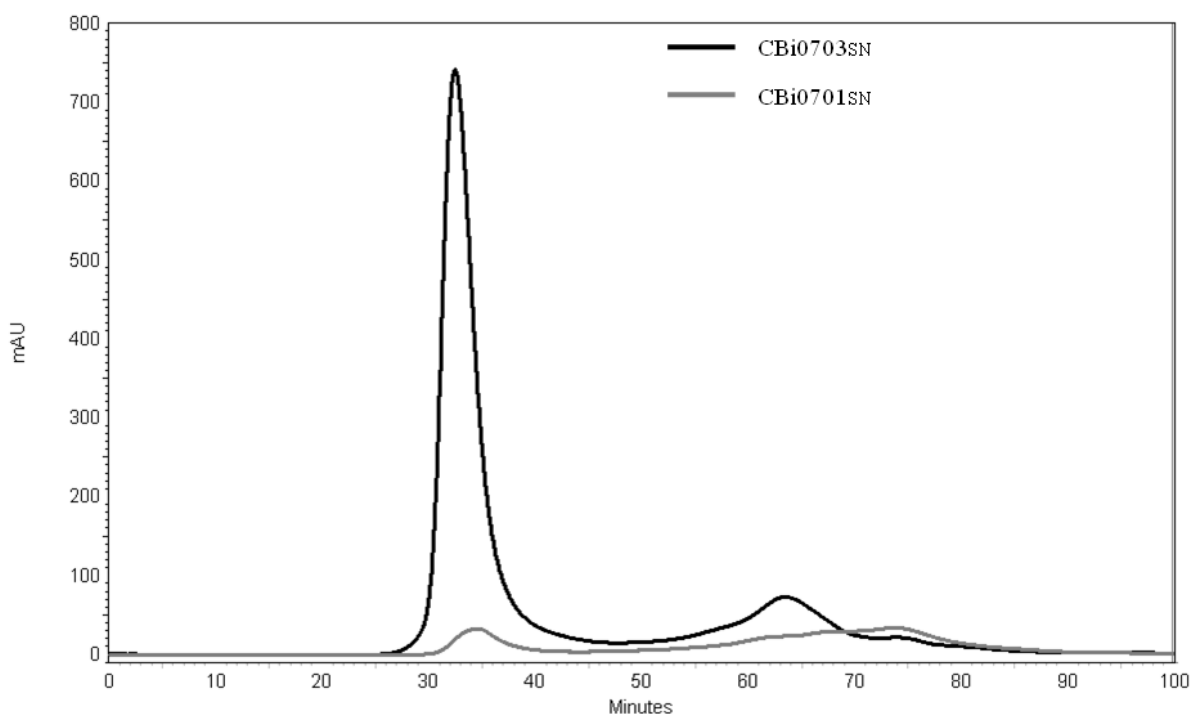


Fig. 16 : Analyse par chromatographie de gel filtration des surnageants de culture de *B.longum*. BI CBI0701_{SN} et BI CBI0701_{SN} (1mg de poudre lyophilisée/ml) sont analysés par chromatographie de gel filtration et présentent au moins un pic exclu (EP contenant les composés bifides de haut poids moléculaire BC). EP est faiblement détecté dans le surnageant de la souche CBI0701 par rapport à la souche CBI0703. Le pic retenu (P1) est uniquement retrouvé dans le surnageant de CBI0703. Les pics EP et P1 ont des temps de rétention respectifs de 27,5min à 43,5 min et 45 min à 68 min.

2.2.4.3 La souche *B.longum* CBI0703 secrète des BCs sous forme agrégée

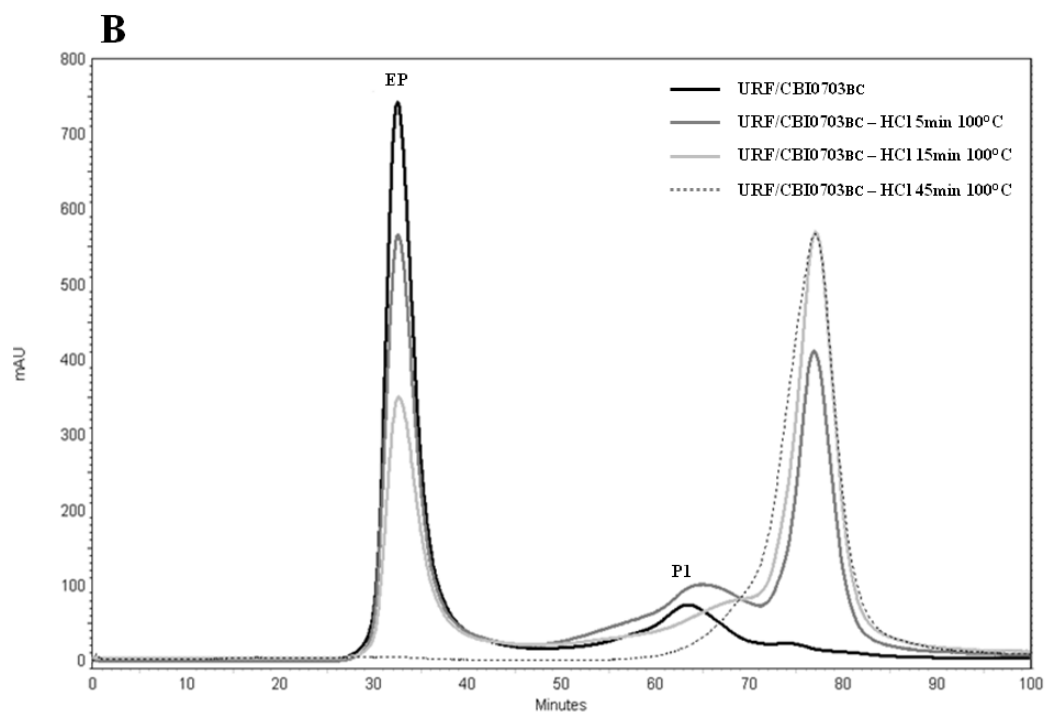
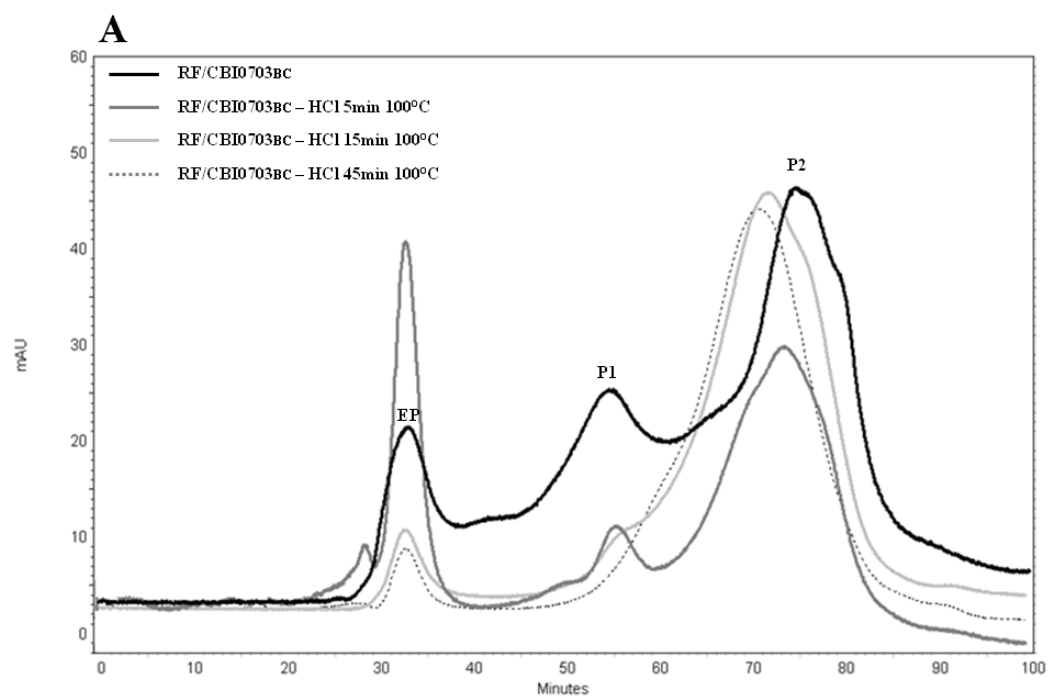
Comme la souche CBI0703 a le meilleur rendement de production des composés, les BCs isolés de la fermentation avec (RF) et sans (URF) régulation du pH sont analysés par chromatographie GF et électrophorèse SDS-PAGE après lyophilisation et traitement acide à chaud ou simple thermisation (Fig. 17A et 17B).

L'analyse par chromatographie GF du BC lyophilisé produit à pH régulé (RF) montre la présence d'un pic exclu (EP) et deux pics retenus (P1 et P2) (Fig. 17A). Le pic P1 est élué à un temps de rétention correspondant à des composés aux alentours de 70kDA. En revanche, le profil obtenu en absence de régulation du pH (URF) est majoritairement composé du pic

attendu EP (Fig.17B). La hauteur du pic PE produit dans les conditions de pH régulé s'élève de manière inattendue après un traitement acide à chaud de 5min alors que la hauteur des pics P1 et P2 diminuent (Fig. 17A).

Pour obtenir un tel résultat, un pH acide est clairement nécessaire, car un traitement neutre à chaud pendant 5 min n'induit pas de modification du profil GF de ce BC_{RF}. En revanche pour le BC produit sans contrôle du pH, le même traitement n'induit de telles modifications du profil GF. Les acides (acétique et lactique) générés lors de la fermentation des bifidobactéries favorisent vraisemblablement une agrégation stable des composés sécrétés à condition de ne pas neutraliser le pH.

On peut penser que la stabilisation des agrégats est liée à une co-agrégation avec l'alpha-lactalbumine (α -LA). L' α -LA précipite et forme des agrégats lors d'incubations longues à pH acide (3.5 à 5.5) et à une température modérée (50-65 °C), de même que l'albumine bovine sérique, la lactoferrine et les immunoglobulines, tandis que bêta-caséine et lactoglobuline restent solubles (Bonnaillie & Tomasula, 2012). A pH neutre, l' α -LA ne précipite pas et les composés bifides sécrétés dans le milieu ne sont pas stabilisés. Au cours du chauffage acide de 5 min du BC RF, l' α -LA, collée aux agrégats bifides produits à pH neutre commencerait à précipiter, ce qui conduirait non seulement à la stabilisation des composés du pic exclu (EP), mais également à l'agrégation des composés de P1 avec PE. Dans ce contexte, la dégradation des agrégats de *Bifidobacterium* néo-formés nécessite un traitement plus long. Le traitement acide à chaud de 15 min de BC RF induit une autre modification du profil de chromatographie GF avec l'apparition d'un pic additionnel montrant un temps de rétention intermédiaire entre P1 et P2. Ces résultats suggèrent que ce pic additionnel résulte de la perte d'unités des composés de haut poids moléculaire agrégés. La dégradation du pic EP est patente après un traitement acide à chaud de 45 min quelque soient les conditions de production.



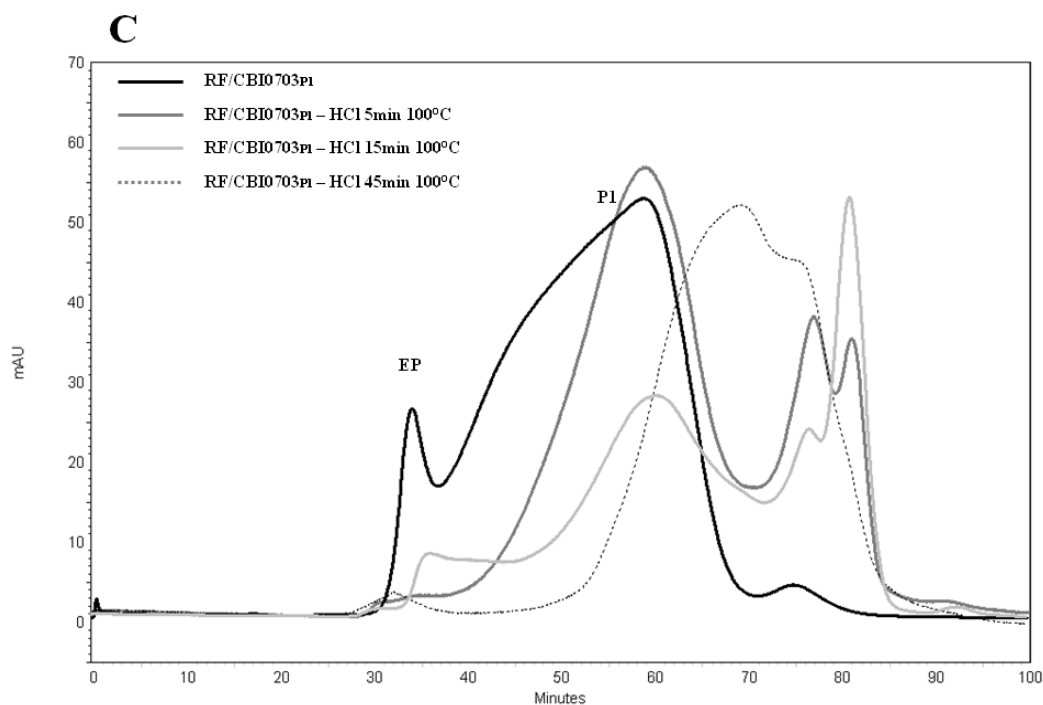


Fig. 17 : Stabilité de BI CBI0703_{BC} et ses fractions. RF BI CBI0703_{BC}, URF BI CBI0703_{BC} et RF BI CBI0703_{P1} ont été soumis à la chromatographie de gel filtration avec ou sans traitement acide à chaud. **A:** RF BI CBI0703_{BC} (4mg de poudre lyophilisée/ml) présentent 3 pics (un pic exclu >600kDa et 2 pics retenus additionnels) suggérant que l'agrégat est instable. EP, P1 et P2 ont des temps de rétention respectifs entre 27,5 à 43,5 min, 45 à 68 min, 69 à 85min. Après un traitement acide à chaud de 5 min, la hauteur du pic EP produit par RF augmente alors que la hauteur des pics P1 et P2 diminuent. Après 15 et 45 min de traitement, le BC présente une hydrolyse évidente des pics EP et P1 et l'émergence d'un pic de transition entre les pics P1 et P2. **B:** URF BI CBI0703_{BC} (1mg de poudre lyophilisée/ml) présente un pic majeur EP (86%) et un pic minoritaire P1 suggérant une meilleure stabilité de l'agrégat. Les pics EP et P1 ont un temps de rétention respectifs de 27,5 à 43,5 min, et de 45 à 68 min. L'augmentation du temps de traitement acide à chaud conduit à une hydrolyse progressive du pic EP et à l'émergence d'un pic retenu tardivement composé de peptides de petite taille. **C:** RF BI CBI0703_{P1} (2mg de poudre lyophilisée/ml) présente un pic EP résiduel et un pic majeur P1. Un traitement acide à chaud de 5min conduit à l'hydrolyse totale du pic EP mais n'est pas suffisant pour dégrader le pic P1. Les traitements acides à chaud de 15 et 45 min conduisent à une hydrolyse évidente du pic P1 favorisant l'émergence de pics retenus tardivement composés de peptides de petite taille.

2.2.4.4 Les agrégats de *B.longum* contiennent une protéine présentant une séquence similaire à celle de la lipoprotéine de *B.breve* C50

Les agrégats de *B.breve* C50 produits sans régulation du pH sont constitués d'unités lipoprotéiques associées à des sucres (Scuotto et al., 2014). Pour déterminer si une structure similaire est produite par la fermentation de *B.longum*, des analyses par électrophorèse en SDS sont menées avant et après traitement acide à chaud (Fig. 18). Aucune bande n'est détectée dans les produits natifs, alors qu'après un traitement acide à chaud de 5 min, on observe une bande protéique autour de 75kDa dans la fraction P1 isolée produite à pH régulé (Fig. 18A). Une bande similaire est détectée après un traitement acide à chaud de 45 min des composés du PE produit à pH régulé. En revanche, ce traitement est inefficace sur les BCs produits sans régulation du pH. Par contre, après incubation d'une nuit en SDS (1%), une bande protéique de 43-45kDa est détectée (Fig. 18B).

L'analyse par spectrométrie de masse des peptides libérés après digestion trypsique de cette bande protéique a révélé 5 peptides de *B.longum* (Tableau 7). La recherche PSI-BLAST dans la base de donnée du NCBI montre des similarités significatives entre ces peptides et une protéine hypothétique sécrétée comprenant un domaine CHAP, également appelée amidase.

L'utilisation d'anticorps anti-BLIF dirigés contre la protéine montre une faible reconnaissance des BCs produits en conditions de pH régulé ou non contrairement à la fraction P1 produite en condition de pH régulé. Les épitopes semblent presque entièrement masqués dans les agrégats alors qu'ils sont toujours accessibles dans les composés de poids moléculaire inférieur. Pour prouver que la protéine est bien synthétisée quelque soient les conditions de fermentation, l'expression du gène *BL1181* a été quantifiée au cours de la fermentation. Comme montré dans la Fig. 19C, le gène est exprimé pendant la phase exponentielle de croissance des bactéries entre 6h et 24h de culture. A chaque temps, le gène de la protéine comprenant un domaine CHAP est plus exprimé que le gène de la sous-unité alpha de l'ADN

polymérase III. En prenant en compte l'ensemble des résultats on peut donc conclure que, la faible reconnaissance des composés de haut poids moléculaire par les anti-BLIF est le résultat du camouflage des épitopes de la protéine du pic EP à l'intérieur de l'agrégat.

D'autre part, la région génomique de 1300pb correspondant à la protéine présumée de *B.longum* CBi0703 a été amplifiée et séquencée. L'alignement de cette séquence avec celle de la lipoprotéine de *B.breve* C50 montre qu'elles partagent 69,39% d'identité. Cependant, la séquence protéine de *B.longum* CBi0703 est plus hydrophobe (48,78%), possède plus d'acides aminés chargés négativement (11,75%) et moins d'acides aminés chargés positivement (9,31%) que la séquence de *B.breve* C50 (respectivement 47,48%; 10,24% et 10,24%). Leurs lipobox sont également différentes, la protéine de *B.longum* CBi0703 présentant le motif -AAAC-.

En outre, en utilisant les amorces situées sur les séquences des gènes flanquant le gène de la lipoprotéine de *B.breve* C50, nous confirmons que la séquence en amont est alignée avec le gène *ftsX* et que la séquence en aval est alignée avec le gène *smpB*, codant respectivement pour une protéine de division cellulaire et une protéine de liaison à la protéine SsrA.

2.2.4.5 Comme pour *B.breve* C50, les composés bifides CBi0703_{BC} contiennent des lipides et des sucres mais ne sont pas reconnus par le TLR6

Contrairement aux composés de haut poids moléculaire de *B.breve* C50, les acides gras sont prépondérants dans les agrégats de *B.longum* (Fig. 19A). Le profil GC/MS est complexe avec au moins 4 pics majeurs. Un premier pic majeur (temps rétention= 37,2 min) montrant un rapport m/z de 242 et de 199 correspond à un acide gras C14:0. En fait, la membrane de *B.longum* est caractérisée par 4 principaux acides gras qui correspondent à 97% de la teneur en acide gras. Il s'agit de l'acide myristique (C14:0), de l'acide palmitique (C16:0), de l'acide

stéarique(C18:0), et de l'acide oléique (C18:1) (Louesdon et al., 2015). L'analyse GC/ MS révèle également un pic majeur correspondant au C14:0h3 (50.23min). Ce pic évoque une contamination avec du LPS souvent détecté en chromatographie. Les deux autres pics majeurs (C16:0 et C18:0) sont de meilleurs candidats à la formation de la lipoprotéine diacylée.

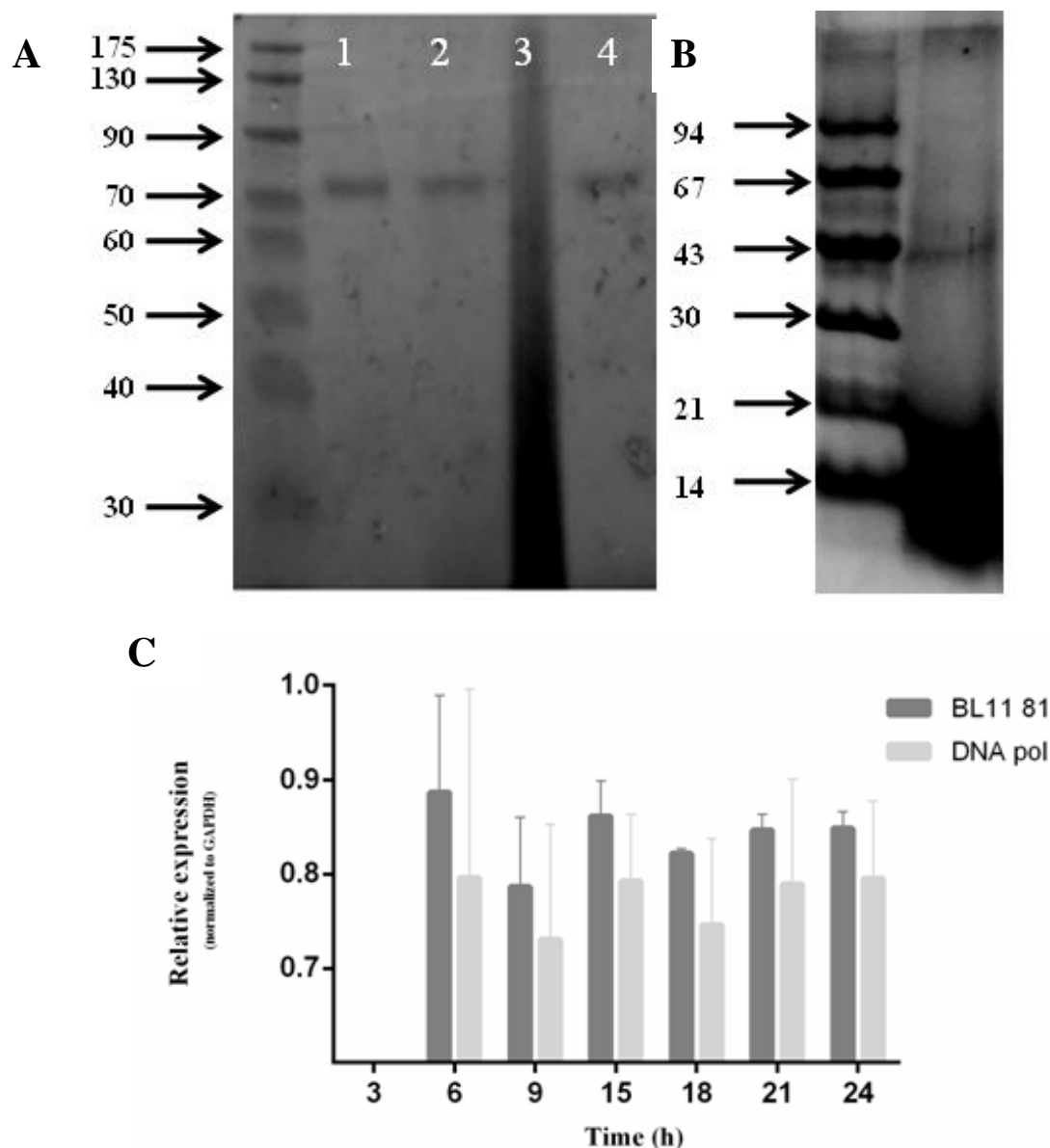


Fig. 18 : Détection de la protéine dans les agrégats par SDS-PAGE (A, B) et expression relative de son gène au cours de la fermentation (C). Les gels SDS-Page ont été colorés avec du bleu de Coomassie. **A:** RF/CBi0703_{P1} (60µg de poudre lyophilisée/puits) ligne 1: traitement acide 45 min à 100°C, ligne 2: 5min 100°C, ligne 3: avant traitement; RF/CBi0703_{BC} (120µg de poudre lyophilisée/puits) ligne 4: traitement acide 45 min à 100°C. **B:** URF/CBi0703_{BC} (140µg de poudre lyophilisée/puits) traité avec 1% SDS une nuit à 37°C. **C:** Expression relative du gène *BL11 81* et de la *DNA polymerase III* normalisée par rapport au gène de la *GADPH* au cours de la fermentation.

Séquences peptidiques	Description	N° d'accèsion	Identité	e-value
DKETLEEQIK	Amidase [<i>B.longum</i>]	WP_014485811.1	10/10	0.34
	Putative lipoprotein with the CHAP domain [<i>B. longum</i>]	WP_023658117.1	10/10	0.34
DYDDAHAAVAQLAR	Conserved hypothetical secreted protein with CHAP domain [<i>B. breve</i>]	WP_015438514.1	14/14	8e-05
	Amidase [<i>B. longum</i>]	WP_007057798	14/14	8e-05
DALSRNEANAASSAATSLSTSK	Amidase [<i>B.longum</i>]	WP_014485811.1	22/22	1e-10
	Putative lipoprotein with the CHAP domain [<i>B.longum</i>]	WP_023658117.1	21/22	2e-09
QAAQTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANR	Amidase [<i>B.longum</i>]	WP_014485811.1	29/29	3e-20
	Putative lipoprotein with the CHAP domain [<i>B.longum</i>]	WP_023658117	27/29	2e-18
NAPSYGLR	Amidase [<i>B.longum</i>]	WP_032683480	8/8	62
	Putative lipoprotein with the CHAP domain [<i>B.longum</i>]	WP_023658117.1	8/8	62

Tableau 7 : BLASTP des peptides issus de BI CBi0703_{BC} retrouvés en spectrométrie de masse.

Le fait que l'acide gras C16 :0 constitue la moitié des lipides de la membrane de *B.longum* conforte l'idée que l'acide palmitique, trouvé dans notre étude, est l'une des chaînes acylées liée à la protéine.

Cependant, les BCs ne sont pas reconnus par le TLR6. La non-reconnaissance des BCs avec le TLR6 et la très faible liaison avec les anti-BLIF, suggère que le degré d'agrégation est déterminant dans l'accessibilité de la lipoprotéine aux anticorps et au TLR6.

La reconnaissance des sucres par la galectine-1 est faible dans les BCs quelque soient les conditions de régulation du pH lors de la production (tableau 4). En revanche la reconnaissance par la galectine-1 du pic P1 est conséquente, ce qui pourrait indiquer une meilleure accessibilité des oligosaccharides exposés à la surface des unités de lipoprotéines. Pendant le traitement acide à chaud, la reconnaissance du pic P1 dégradé par la galectine-1 diminue alors que celle des BCs produits à pH régulé augmente. Cela signifie probablement dans ce dernier cas que des unités oligosaccharidiques sont mises en évidence lors de la dégradation des agrégats néo-formés.

L'analyse des sucres de CBi0703_{BC} (100µg) par GC/MS montre que le glucose est majoritaire avec 7,83µg, suivi du mannose (7,51 µg), de la N-Acetylgalactosamine (1,57µg), de la N-Acetylglucosamine (0,55µg), et du galactose (0,13µg). Le rhamnose est presque indétectable (0,006µg) (Fig. 19B). Il est à noter que les agrégats de *B.breve* et *B.longum* ont en commun un taux de glucose et de mannose élevé. Comme le domaine CHAP est un récepteur présumé de glucane, on peut penser que, à l'instar de *B.breve*, la transglycosylation du lactose est réalisée pendant la fermentation de *B.longum* (Scuotto et al., 2014). Toutefois, la concentration en N-acétylgalactosamine est plus élevée dans les agrégats de *B.longum* (environ 40 fois plus que dans ceux de *B.breve*) alors que le galactose est moins présent. Bien que les deux agrégats soient capables de se lier à la Gal-1, la composition en sucres en périphérie de l'agrégat est donc différente.

Par ailleurs, bien que *B.breve* et *B.longum* produisent des agrégats en condition acide, leur faculté à lier le TLR6 diffère. La séquence protéique de *B.longum* et la teneur en lipide sont en faveur d'une hydrophobicité plus importante responsable de la faible exposition de la lipoprotéine à l'intérieur de l'agrégat.

Pics CBi0703 *	BLIF (µg/mg)	GAL-1 (µg/mg)
<i>Fermentation non régulée</i>		
BC natif	0,12 ± 0,06	5646 ± 3942
Traitement acide à chaud de BC		
5min	0,05 ± 0,02	423 ± 59
45min	0,02 ± 0,01	175 ± 53
<i>Fermentation régulée</i>		
BC natif	0,09 ± 0,03	3183 ± 1376
Traitement acide à chaud de BC		
5min	0,10 ± 0,05	1615 ± 581
45min	0,10 ± 0,05	87365 ± 15730
P1 natif	1,87 ± 1,00	278577 ± 90042
Traitement acide à chaud de P1		
5min	1,00 ± 0,28	127333 ± 9252
45min	0,18 ± 0,07	9533 ± 2678

*pics isolés à partir de la GF de Bl CBi0703_{SN}

Tableau 8 : Reconnaissance de Bl CBi0703_{BC} et de la fraction P1 par la Gal-1 et anti-BLIF en fonction de la régulation du pH au cours de la fermentation.

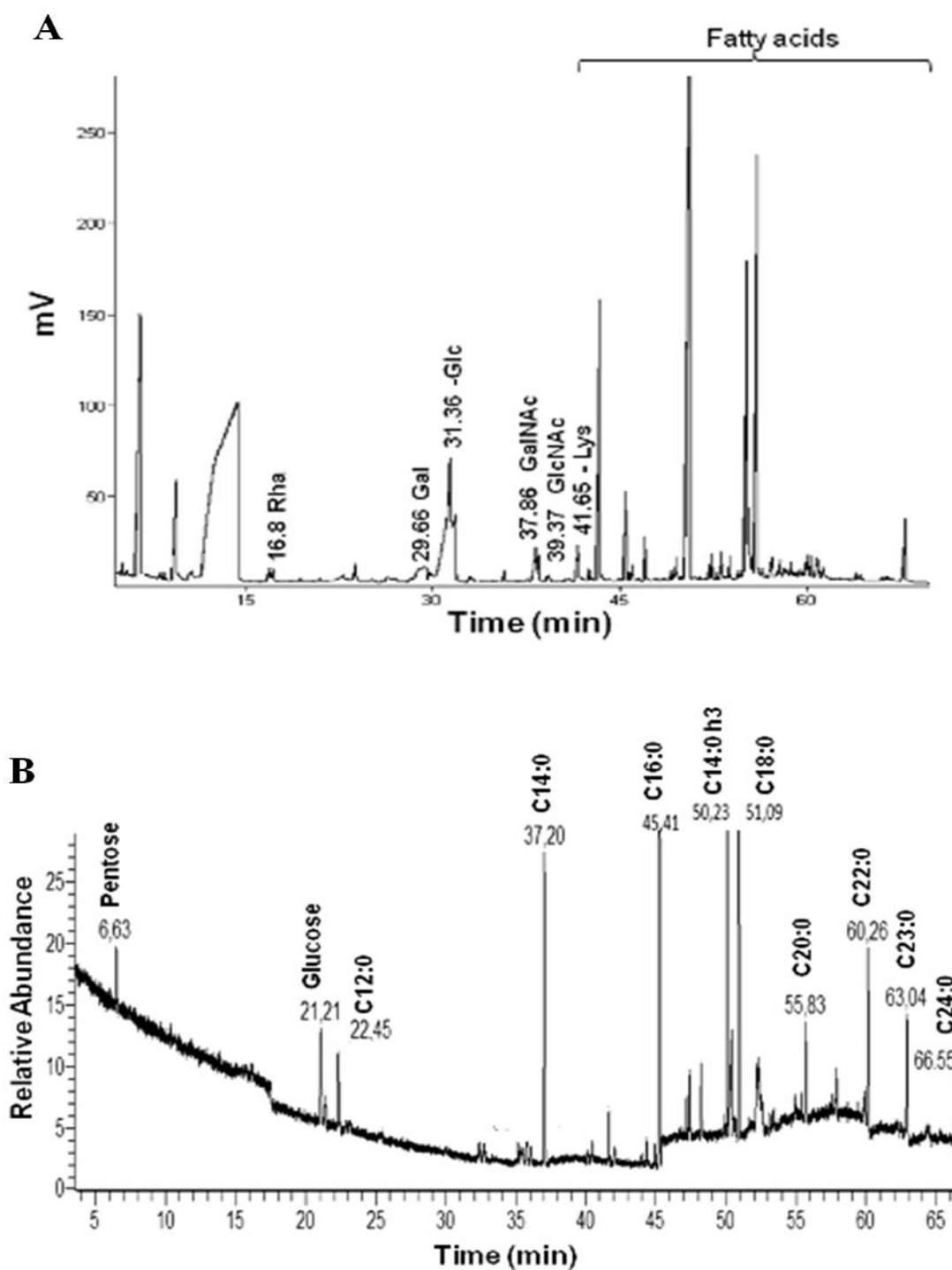


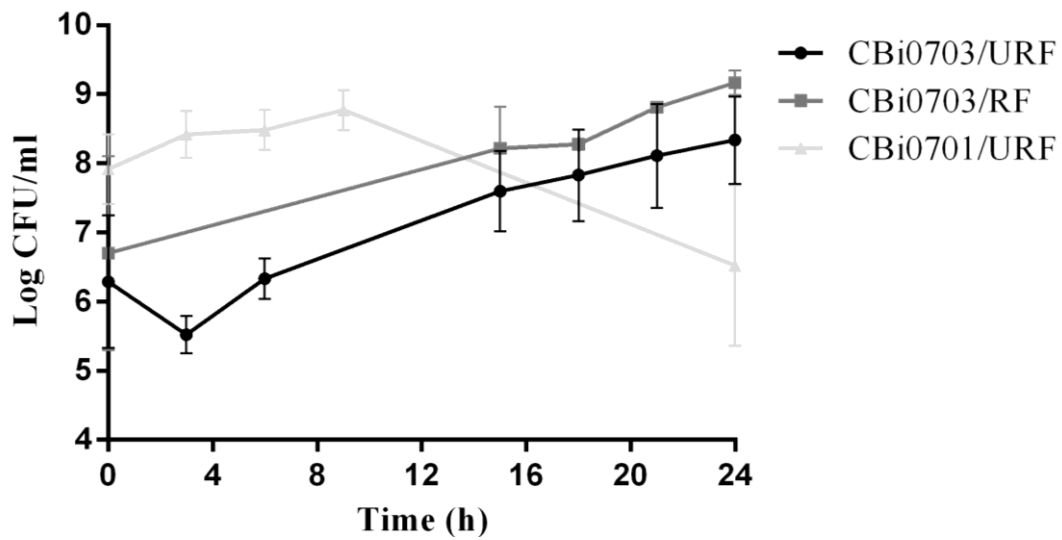
Fig. 19: Spectres GC/FID et GC/MSeEI de BI CBi0703_{BC}. (A) Spectre GC/FID. Les pics identifiés correspondent au rhamnose (16,8 min), au galactose (28,66 min), au glucose (31,36 min), à la N-acetylgalactosamine (37,86 min), à la N-acetylglucosamine (39,37 min) et à la lysine-standard interne (41,65 min). Les pics avec un temps rétention inférieur à 15min n'ont pas été identifiés et les pics retenus après la lysine correspondent à des acides gras. (B) Spectre GC/MSeEI. Les pics identifiés correspondent à du C12:0 (22,45 min), du C14:0 (37,20 min), du C16:0 (45,41 min), du C14:0h3 (50,3 min), du C20:0 (55,83 min), du C22:0 (60,26 min), du C23:0 (63,04 min), du C24:0 (66,55 min).

Comme prédit *in silico*, le gène de *B.longum* présentant une forte homologie avec la lipoprotéine de *B.breve* C50, code pour une lipoprotéine sécrétée sous forme agrégée pendant la fermentation. Les agrégats de *B.longum* et *B.breve* partagent la même structure globale (lipoprotéine avec un domaine CHAP associée à des sucres). Cependant, la séquence protéique et la teneur en sucres et lipides diffèrent. Fait remarquable, les agrégats de *B.longum* ne sont pas capables de se lier au TLR6. Contrairement aux agrégats de *B.breve* C50, il est peu probable que les agrégats de *B.longum* puissent induire une réponse immunitaire via la voie du TLR6.

[illegible]

109

A



B

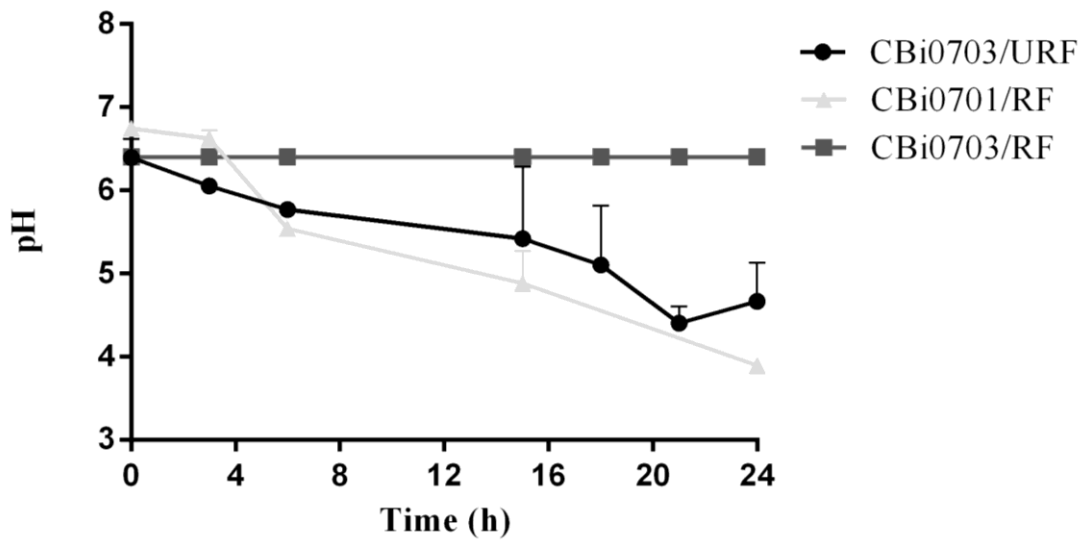


Fig. S2 : Croissance des souches de *B.longum* CBI0703 et CBI0701 au cours du temps. (A) Suivi de la croissance bactérienne par culture (Log UFC/ml); (B) Suivi du pH au cours du temps.

CHAPITRE 3 : Mécanisme d'action des composés bifides

3.1 Objectifs de l'étude

Les agrégats de *B.longum* n'étant pas reconnus par le récepteur TLR6, la question de leur potentiel anti-inflammatoire s'est posée. Un travail de recherche effectué parallèlement par le Dr. S. Djorie (Djorie, 2014) a montré que le traitement de souris par des agrégats de *B.longum*:

- protège de l'arthrite induite par le collagène ou les anticorps anti-collagène associés aux lipopolysaccharides.
- rétablit au niveau de cellules dendritiques spléniques l'expression de gènes influencés par un microbiote humain de patient arthritique.

En absence de reconnaissance du TLR6, une capture compétitive des agrégats bifides pourrait empêcher la capture de bactéries d'origine buccale et/ou intestinale, et prévenir la rémanence de résidus bactériens pro-inflammatoires au site articulaire, diminuant ainsi l'inflammation.

Pour valider cette hypothèse, il est nécessaire d'apporter la preuve :

- 1) d'une capture des agrégats bifides.
- 2) d'une modulation de la translocation bactérienne

Plusieurs approches sont tentées:

- détection par microscopie ou cytométrie de flux d'agrégats intracellulaires marqués (Fig. 20).
- détection de bifidobactéries intratissulaire par PCR après gavage (Fig. 20)
- analyse de la translocation bactérienne *ex-vivo*

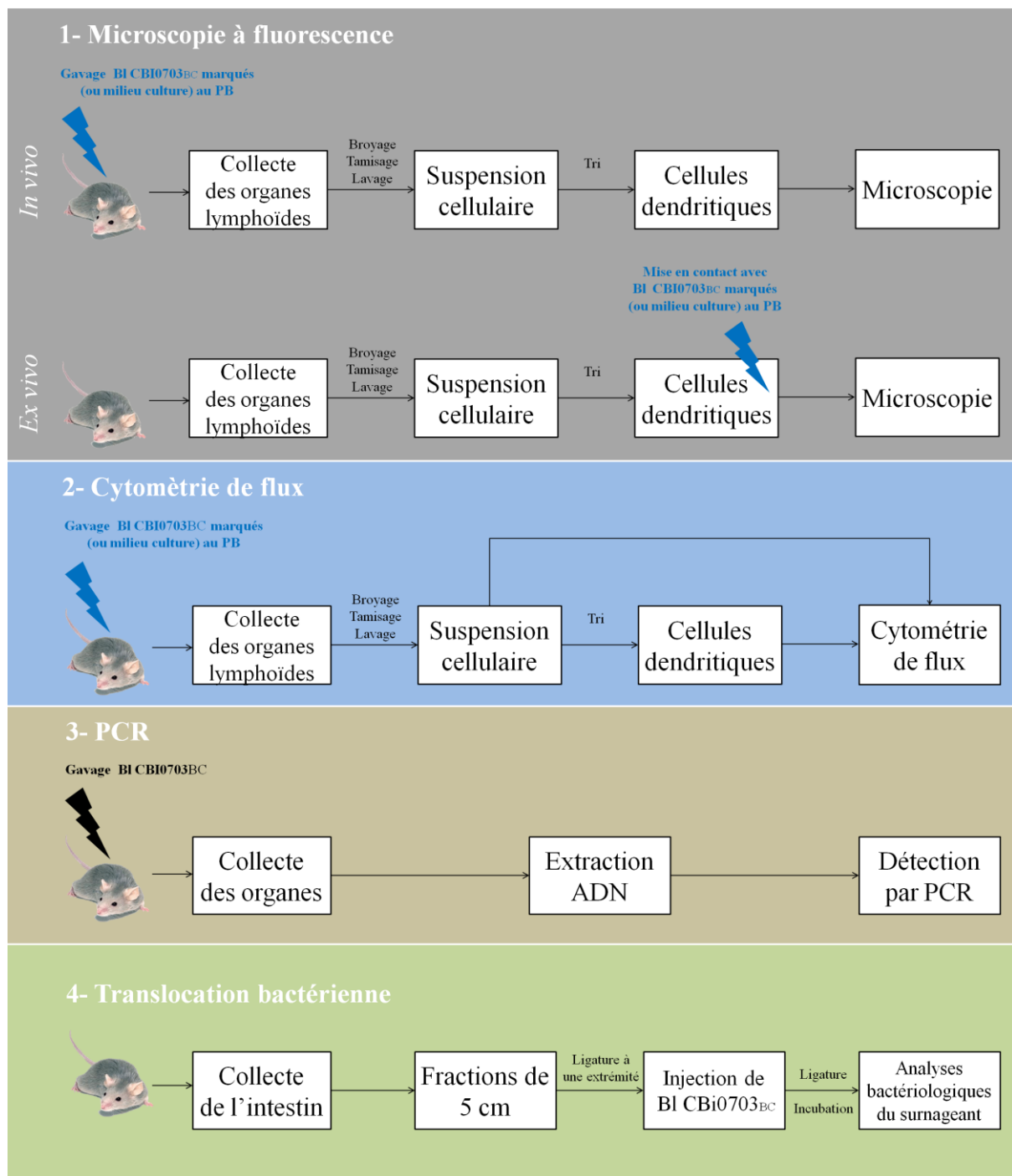


Fig. 20 : Stratégies mises en place pour valider l'hypothèse de capture des agrégats bifides.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Marquage des agrégats et des extraits de milieu de culture

Les composés bifides sont préparés comme décrits en 2.2.3.3 du chapitre 2. Pour mémoire, la fermentation de la souche de *B.longum* CBi0703 est conduite à pH non régulé dans le milieu de production puis le surnageant de culture est recueilli après centrifugation à grande vitesse, concentré par ultrafiltration (100 kDa), dialysé à l'aide d'une membrane de 10 kDa et les agrégats bifides sont isolés par chromatographie de gel filtration du surnageant concentré BI CBi0703_{SN}. Les extraits de milieu de culture, utilisés comme contrôle, sont obtenus après acidification du milieu de production à pH 4,8 par ajout d'une solution d'acide acétique (3M)/acide lactique (2M). Après une incubation à 37°C pendant 48h, le surnageant de milieu culture est recueilli par centrifugation à grande vitesse (11000 x g), concentré par ultrafiltration (100 kDa) puis dialysé à l'aide d'une membrane de 10 kDa comme précédemment. Après lyophilisation, on vérifie par chromatographie de gel filtration sur Superdex200® la présence d'agrégat (pic exclu= 61% de l'aire totale) (Annexe II).

Plusieurs marquages sont essayés :

- IVIS Xenolight™ CF750 ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 755/775 \text{ nm}$) (Perkin Elmer) adapté au système IVIS principalement dédié à l'imagerie *in vivo*. Les complexes bifides BI CBi0703_{BC} préparés comme décrits ci-dessus sont marqués via leur partie protéique selon les recommandations du fournisseur et stockées à -20°C jusqu'à 3 jours avant utilisation.

- Tétraméthylrhodamine (TRITC) ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 541/572 \text{ nm}$) (Thermo Scientific). Les complexes bifides BI CBi0703_{BC} sont marqués via leur partie protéique selon les

recommandations du fournisseur. Les complexes bifides marquées sont stockées à -20°C jusqu'à 3 jours avant utilisation.

- Pacific Blue™ ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}=410/455$ nm) (Life Technologies)

Les agrégats bifides BI CBi0703_{BC} ou l'extrait de milieu de culture en solution dans du tampon carbonate (1M) sont marqués via leur partie protéique (respectivement ratio mole dye/mole protéines=2,77 et 2,25).

3.2.2 Système IVIS 50

Le système IVIS 50 (Perkin Elmer) est un système principalement dédié à l'imagerie *in vivo*. Ce système permet de suivre la distribution de molécules fluorescentes. Il est composé une caméra très sensible, d'une chambre noire permettant de minimiser la lumière incidente et d'un logiciel de traitement des résultats. Ce système n'étant pas adapté à l'analyse des organes profonds, nous avons détourné son utilisation primaire afin d'analyser des broyats d'organes et suspensions cellulaires en *ex vivo*. Cette méthode permet d'améliorer la puissance du signal fluorescent détectable et de diminuer la détection de la fluorescence aspécifique en shuntant sa diffusion à travers le corps de l'animal (et notamment l'épaisseur de la peau des rats).

3.2.2.1 Animaux

Les essais chez l'animal sont conduits en conformité avec la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Les complexes marqués au CF750, dilués dans l'eau de biberon, sont administrés *per os* à des rats CD (Charles River) pendant une nuit à la concentration de 0,6µg/ml correspondant à la dose efficace anti-arthrosique. Les rats sont sacrifiés le lendemain matin par surdosage

d'anesthésique et les organes (rein, rate, foie, poumon, thymus, plaques de Peyer) sont collectés.

3.2.2.2 Préparation des suspensions cellulaires

Une fraction de chaque organe est broyée et tamisée à l'aide de tamis de 70µm puis 30µm de diamètre de pore, afin d'obtenir les suspensions cellulaires. Les organes et suspensions cellulaires sont déposés dans des plaques 6 ou 24 puits pour être analysés par le système IVIS.

3.2.3 Analyse par Microscopie à fluorescence

3.2.3.1 Animaux

Comme précédemment, les essais chez l'animal sont conduits en conformité avec la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Des souris femelles C57BL/6 (Charles Rivers) et NOD/LTJ (Charles Rivers) âgées respectivement de 5 semaines et 7 semaines sont placées sous régime R125 (Safe-diets), pour diminuer la fluorescence naturelle de l'alimentation RO3 et reçoivent de l'eau stérile comme boisson.

Pour les essais de contact direct cellules-agrégats, les souris C57BL/6J et NOD sont euthanasiés par surdosage d'anesthésique en deux étapes (50 mg/kg- de pentobarbital sodique [CEVA-Santé animale] en IP suivi d'une seconde injection de DOLETHAL [Vetoquinol] à 180-200 mg/kg en IP).

Pour les essais de capture *in vivo*, un lot de souris C57BL/6J et NOD (Charles Rivers) sont gavés à la dose de 25µg ou 50µg de poudre lyophile/kg avec soit les agrégats Bl CBI0703_{BC} ou un extrait du milieu de production, marqués au Pacific Blue. Le lendemain (T+18h post-gavage) les souris sont sacrifiées par surdosage d'anesthésique comme précédemment décrit.

3.2.3.2 Préparation des suspensions cellulaires (essai ex vivo)

La moelle osseuse et le thymus de chaque souris sont prélevés, mis en suspension dans du milieu RPMI et les suspensions sont tamisées (pore de 70µm puis 40µm) avant d'être réparties dans une plaque de 24 puits à raison de 1E+07 cellules/puits.

La solution d'agrégats marqués BI CBI0703_{BC} est ajoutée à la suspension cellulaire à raison de 0,3 et 0,15µg/ml (100µl), afin d'obtenir un volume final de 1ml par puits. Une solution d'eau stérile (100µL/puits) est ajoutée à la suspension cellulaire et sera utilisée comme témoin.

La plaque est incubée 24h à 72h sous CO₂ 5% à 37°C. Après incubation, un aliquot de chaque puits est déposé sur lame de Malassez pour estimer la mortalité cellulaire (méthode au bleu Trypan), avant dépôt sur lame pour lecture microscopique à fluorescence (20µL). Cette dernière est montée avec du PFA 4% et du Fluor Save™ (Merck Millipore). La lecture des lames au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse E600) est réalisée sous 3 filtres (DAPI pour le Pacific Blue/ TRITC/ FITC) afin de distinguer les cellules émettant de la fluorescence spécifique du marquage au Pacific Blue (signal sous filtre DAPI uniquement) des cellules émettant de l'autofluorescence (signal sous les 3 filtres DAPI/TRITC/FITC).

3.2.3.3 Préparation des suspensions cellulaires (essai in vivo)

La moelle osseuse et le thymus de chaque souris préalablement gavées sont prélevés, mis en suspension dans du tampon PEB (PBS pH 7,2 + EDTA 2mM) (Miltenyi) avec 0,5% de BSA (VWR) et les suspensions sont tamisées (pore de 70µm puis 40µm). Les cellules dendritiques Cd11c⁺ sont isolées par sélection positive via les systèmes « Cd11c microbeads, mouse ». Un aliquot est déposé sur lame microscopique. Le montage de la lame et l'analyse sont effectués comme précédemment décrits.

3.2.4 Analyse par cytométrie de flux

3.2.4.1 Animaux

Des souris DBA/1 (Harlan) (n=16) reçoivent par gavage les agrégats bifides BI CBi0703_{BC} ou de l'extrait de milieu marqués au Pacific Blue à la dose de 50 ou 100µg/kg, ou de l'eau stérile (souris contrôles) et sont mises à mort 15h ou 72h post-gavage, par surdosage d'anesthésique comme précédemment décrit. Nous avons choisis cette lignée murine pour deux raisons :

- 1) des essais préalables chez ces souris ont montré que les agrégats bifides ont des propriétés anti-inflammatoires dans le modèle d'arthrite induite par le collagène ou les anticorps anti-collagène associés aux lipopolysaccharides.
- 2) Les essais réalisés chez la souris NOD ont montré une autofluorescence importante ne permettant pas de distinguer une fluorescence cellulaire spécifique des agrégats marqués.

3.2.4.2 Banc optique

Afin de sensibiliser la détection des cellules fluorescentes, un tri cellulaire est effectué sur plusieurs suspensions. Les marqueurs cellulaires sont :

- CD11c : exprimé sur la surface de la plupart des cellules dendritiques et sous populations.
- PDC-TREM : marqueur spécifique des cellules dendritiques plasmacytoïdes.
- CD4 : exprimé sur la surface de la plupart des thymocytes et des sous populations de lymphocytes T; faiblement représenté sur les macrophages et cellules dendritiques.
- CD8a : exprimé sur la plupart des thymocytes, sous-ensemble de cellules T, des cellules NK, les cellules dendritiques lymphoïdes.

Pour ce faire, une étude préliminaire sur les choix des fluorophores associés aux anticorps est réalisée afin d'éviter les recouvrements spectraux entre les différents couples Anticorps/ Isotype (Ozyme). Le banc optique choisi est présenté dans le tableau 9.

Anticorps	Isotypes
Ac anti-CD4 Alexa Fluor 647	Alexa Fluor 647 Rat IgG2b, isotype Ctrl
Ac anti-CD11c Brillant Violet 605	Brillant Violet 605 Armenian Hamster IgG
Ac anti-CD8a APC/Cy7	Rat IgG2a isotype Ctrl APC/Cy7
Ac anti-PDC-TREM PE	Rat IgG2a, Isotype Ctrl PE

Tableau 9 : Banc optique utilisé dans cette étude.

Dans certains essais, une pré-sélection positive des cellules CD11c par le système Miltenyi est effectuée avant analyse par FACS (Fluorescence-activated cell sorting). Les différentes populations cellulaires sont analysées et/ou triées à l'aide de la technologie FACS Aria™ (BD biosciences, plateforme de cytométrie et de tri cellulaire, IFR 114-IRCL-Lille). La stratégie d'analyse globale est présentée ci-après dans la figure 21.

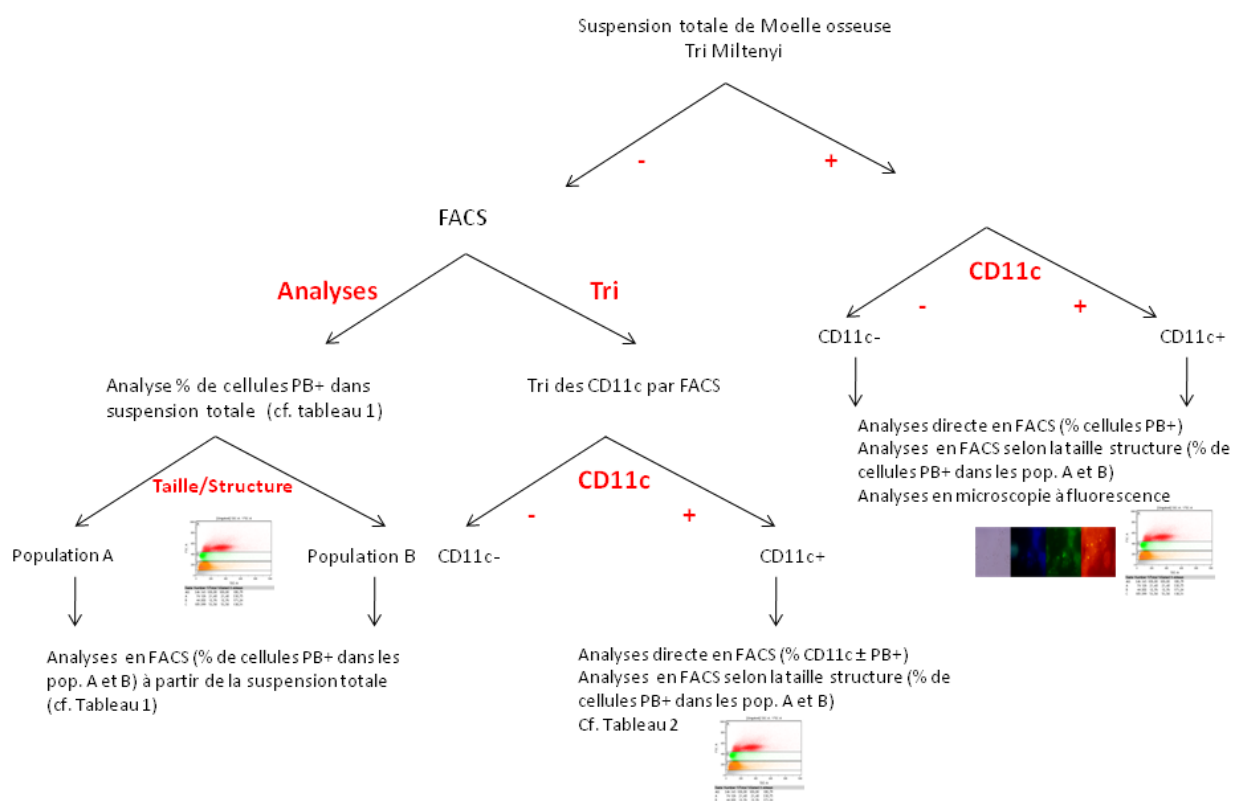


Fig. 21 : Stratégie d'analyse globale par cytométrie de flux.

3.2.4.3 Analyses statistiques

L'autofluorescence pouvant être élevée selon l'état du prélèvement au moment de l'analyse ou du tri cellulaire, les essais sont validés sur la base de l'émission de fluorescence dans le bleu des échantillons issus des souris contrôles.

Sur les essais validés (valeurs à l'intérieur de l'intervalle de confiance), les variations de taux de cellules Pacific Blue positives chez les souris sont analysées selon le traitement administré par le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Le test post-hoc de Coroner-Iman avec correction de Bonferroni est utilisé pour identifier les traitements influençant le taux de cellules.

3.2.5 Amplification génique

Les souris C57BL/6J (n=4) (Charles Rivers) reçoivent par gavage les agrégats bifides BL CBi0703_{BC} à une dose de 50µg de poudre lyophile/kg. Le lendemain matin (18h post-gavage), les souris sont sacrifiées par surdosage d'anesthésique comme précédemment décrit. Les organes suivants sont collectés : iléon, caecum, côlon, plaques de Peyer, moelle osseuse, rate. L'ADN bactérien total est extrait à l'aide du kit NucleoSpin ® Tissue (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'élution est réalisée avec 100 µl de tampon de Elution Buffer (BE) (Macherey Nagel), et les extraits d'ADN purifiés sont stockés à -20°C. Le thermocycleur Mastercycler ® ep Realplex (Eppendorf) est utilisé pour l'amplification effectuée avec les amorces BL1181qanti 5'-GCAGACACCTATTCCGACCT-3' et BL1181qsens 5'-CCAGCTGCTGCTTGAGTTC-3', synthétisées par Eurogentec. Chaque mélange réactionnel de 25µl est composé de PCR Master Mix (Thermo Scientific) contenant 0,625 Unités d'ADN Taq polymérase ThermoPrime, de 1,5 mM de chlorure de magnésium, de 0,2 mM de dNTP, de 75 mM Tris-HCl, de 0,01% de Tween 20 ®, de 0,5µM de chaque amorce et de 5µl d'ADN. L'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 minutes est

suivie par 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, puis une étape d'hybridation des amorces à 62°C pendant 30 secondes, en fonction du type d'amorces utilisées, suivie d'une étape d'extension à 72°C pendant 30 secondes. Une melting curve est ajoutée au programme pour déterminer la spécificité de l'amplicon. Les amplicons sont également déposés sur gel d'agarose 2% pour vérifier leur taille. La taille de l'amplicon attendu est de 85pb.

3.2.6 Translocation bactérienne après traitement par les agrégats bifides

Des souris C57-BL/6 et CD1 (Laboratoire Janvier) âgées respectivement de 8 semaines et de 5 semaines sont mises à mort par surdosage d'anesthésique. L'iléon est prélevé stérilement puis fractionné en morceaux de 5cm après dénombrement des plaques de Peyer. Les fragments (sans ou avec plaques de Peyer) sont ligaturés à une extrémité à l'aide de fil préalablement stérilisé. Selon les conditions, une solution de BLCBI0703_{BC} à la dose de 0,25mg/L (200µl, soit 50ng) ou de PBS stérile (200µL) est injectée à l'intérieur des pièces iléales à l'aide d'une gauge pour éviter de percer l'iléon. Puis la deuxième extrémité est fermée par une deuxième ligature. Chaque fragment ligaturé est ensuite plongé dans plusieurs bains de PBS stérile avant d'être placé dans des puits de plaque 6 puits, contenant 5ml de solution de Ringer-HCl cystéinée (0,12g/L de CaCl₂, 0,105g/l de KCl, 0,05g/L de NaHCO₃, 2,25g/l NaCl, 0,3g/L de L-Cystéine) par puits. La plaque est incubée à 37°C à l'étuve sous 5% CO₂ (Heracell 150i™ - Thermo Scientific) pendant 6 heures. Des prélèvements (2x 100µL) des bains de Ringer sont effectués dans chaque puits à T0, T3h et T6h pour ensemencement sur gélose Columbia (Difco) supplémenté avec 5% de sang de cheval défibriné (Eurobio) (pour dénombrement des bactéries aérobies et anaérobies facultatives), Slanetz (Oxoid)

(entérocoques) et EMB (entérobactéries). Les boîtes sont incubées pendant 48h à 37°C avant lecture.

Identification des souches

L'ADN bactérien des colonies isolées sur boîte est extrait à l'aide du kit NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'élution est réalisée avec 100 µl de tampon de Elution Buffer (BE) (Macherey Nagel), et les extraits d'ADN purifiés sont stockés à -20°C. Le thermocycleur Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf) est utilisé pour l'amplification. Les amorces ont été synthétisées par Eurogentec et sont présentées dans le tableau 10.

Espèces	Amorces	Amplicon (pb)
<i>L.reuteri</i>	Fw : 5'-ACC-GAGAACACCGCGTTATTT-3' Rv : 5'-CATAACTTAACCTAAACAATCAAAGATTGTCT-3'	93
<i>L.johnsoni</i>	Fw : 5'-CTCAGGACGAACGCTGGCGG-3' Rv : 5'-GCAAGCACTAAAATCATCTAGGCAAGC-3'	74
<i>E.faecalis</i>	Fw : 5'-ACCGCCACTATTTCTCGGACAGC-3' Rv : 5'-GTCGTCCCTTTGGCAAATAA-3'	518

Tableau 10 : Couples d'amorces utilisées pour l'identification des souches.

Chaque mélange réactionnel de 25µl est composé de PCR Master Mix (Thermo Scientific) contenant 0,625 Unités d'ADN Taq polymérase ThermoPrime, de 1,5 mM de chlorure de magnésium, de 0,2 mM de dNTP, de 75 mM Tris-HCl, de 0,01% de Tween 20®, de 0,5µM de chaque amorce et de 2µl d'ADN. L'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 minutes est suivie par 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, puis une étape d'hybridation des amorces à 62°C pendant 30 secondes suivie d'une étape d'extension à 72°C pendant 30 secondes. Une melting curve est ajoutée au programme pour déterminer la spécificité de l'amplicon. La taille de l'amplicon attendu est présentée dans le tableau 10.

3.3 Résultats

3.3.1 Mise au point de la méthode

Dans un premier temps, les essais de mise au point avec le système IVIS se sont avérés infructueux. En effet, le seuil de détection de la technologie est trop faible pour détecter les complexes aux doses efficaces anti-arthrosiques. De plus, l'émission de fluorescence aspécifique apportée soit par l'autofluorescence émise par les organes soit par l'alimentation constitue un obstacle majeur pour détecter le signal spécifique des complexes marqués au CF-750 dans le spectre utilisé (Annexe III).

Dans un second temps, nous avons choisi d'utiliser le TRITC pour marquer les agrégats bifides. Mais, nous observons une autofluorescence cellulaire importante aux longueurs d'ondes d'émission du TRITC, ne permettant pas de détecter la fluorescence spécifique émises par les agrégats marqués. Il ressort également de ces essais que les émissions de fluorescence aspécifique sont exacerbées chez les souris NOD, résultat possible d'une lyse cellulaire importante. Nous avons donc choisi de poursuivre l'analyse avec d'autres lignées murines (Annexe IV).

Enfin, ces essais préliminaires de marquage nous ont amené à choisir le Pacific Blue comme marqueur, l'autofluorescence des cellules dans ces longueurs d'onde étant plus faible que pour le TRITC.

3.3.2 Essai *ex-vivo* (analyse par microscope à fluorescence)

Ne sont présentés que les résultats issus de culture des cellules d'organes sans pré-isolément. En effet, après plusieurs essais nous avons observé que le pré-isolément par le système MACs (Miltenyi Biotech) augmente la mortalité cellulaire et donc la fluorescence aspécifique.

Dans cette étude, un minimum de 20 champs microscopiques (grossissement x60) a été analysé microscopie à fluorescence par suspension cellulaire à T24, T48 et T72h dans chaque condition (Témoin vs agrégats). Chaque essai a été répété au minimum 3 fois.

La figure 21 montre la présence de fluorescence dans une cellule de thymus après 24h d'incubation en présence de 0.3µg/ml et après 48h d'incubation en présence de 0.15µg/ml de BI CBI0703_{BC} marqué au Pacific Blue (détection uniquement en présence du filtre DAPI). Il n'a pas été possible de mettre en évidence de cellules n'émettant de fluorescence qu'en DAPI lorsqu'elles sont incubées seules (Fig. 22). On constate par ailleurs que peu de cellules émettent une fluorescence pendant les premières 48h d'incubation que ce soit en présence ou absence de molécule marquée.

Dans la moelle osseuse, c'est après 24h d'incubation en présence de 0.3µg/ml que l'on observe la rare capture d'agrégats marqués (Fig. 23). Des cellules prises dans un voile de matrice montrent également une fluorescence bleue sur un autre champ (Fig. 23). Par contre, aucune cellule de la suspension témoin ne montre une fluorescence exclusivement dans le bleu. La taille supérieure des cellules dans la suspension témoin les différencie également de celles des suspensions avec agrégats après 48h d'incubation (Fig. 23).

En conclusion, la faible fluorescence globale à 24h permet de confirmer que les cellules présentent une vitalité satisfaisante. Après 48h d'incubation le nombre de cellules émettant de la fluorescence dans les trois couleurs augmente et les résultats sont plus difficiles d'interprétation.

Il est possible de détecter de rares cellules du thymus et de la moelle osseuse émettant uniquement dans le bleu en présence de 0.3µg/ml de BI CBI0703_{BC} marqué après 24h d'incubation. Lorsqu'une concentration de 0.15µg/ml est utilisée, une cellule du thymus a été détectée fluorescente après 48h d'incubation. Eu égard à la baisse de vitalité après 48h d'incubation, il est difficile de conclure sur cette seule détection.

Ces résultats indiquent qu'en présence de BI CBI0703_{BC} marqué, seules quelques cellules peuvent capter la macromolécule pour une concentration minimum de 0.3µg en contact avec 10 millions de cellules.

3.3.3 Essais *in vivo*

3.3.3.1 Analyse par microscope à fluorescence

On détecte au moins une cellule dendritique Cd11c⁺ isolées de moelle osseuse émettant une fluorescence spécifique (filtre DAPI) 18h après gavage avec 25µg/kg d'agrégats marqués (Fig. 24). Cette faible détection contraste avec le nombre de cellules dendritiques Cd11c⁺ fluorescentes observée chez les souris gavées par l'extrait de milieu de culture (Fig. 24). Cette fluorescence n'étant pas retrouvée chez les souris n'ayant reçu que de l'eau stérile, nous pouvons conclure que les agrégats de protéines de lait sont captés depuis l'intestin (Fig. 24).

En conclusion, les résultats indiquent que le modèle choisi est pertinent car suffisamment sensible pour détecter la capture d'agrégats protéiques à partir de l'intestin et la circulation secondaire des cellules dendritiques présentant ces antigènes vers la moelle osseuse. Les observations avec les agrégats bifides sont inattendus : la co-agrégation entre les protéines du lait et les lipoprotéines bifides diminuent voire abrogent la capture des antigènes protéiques alimentaires.

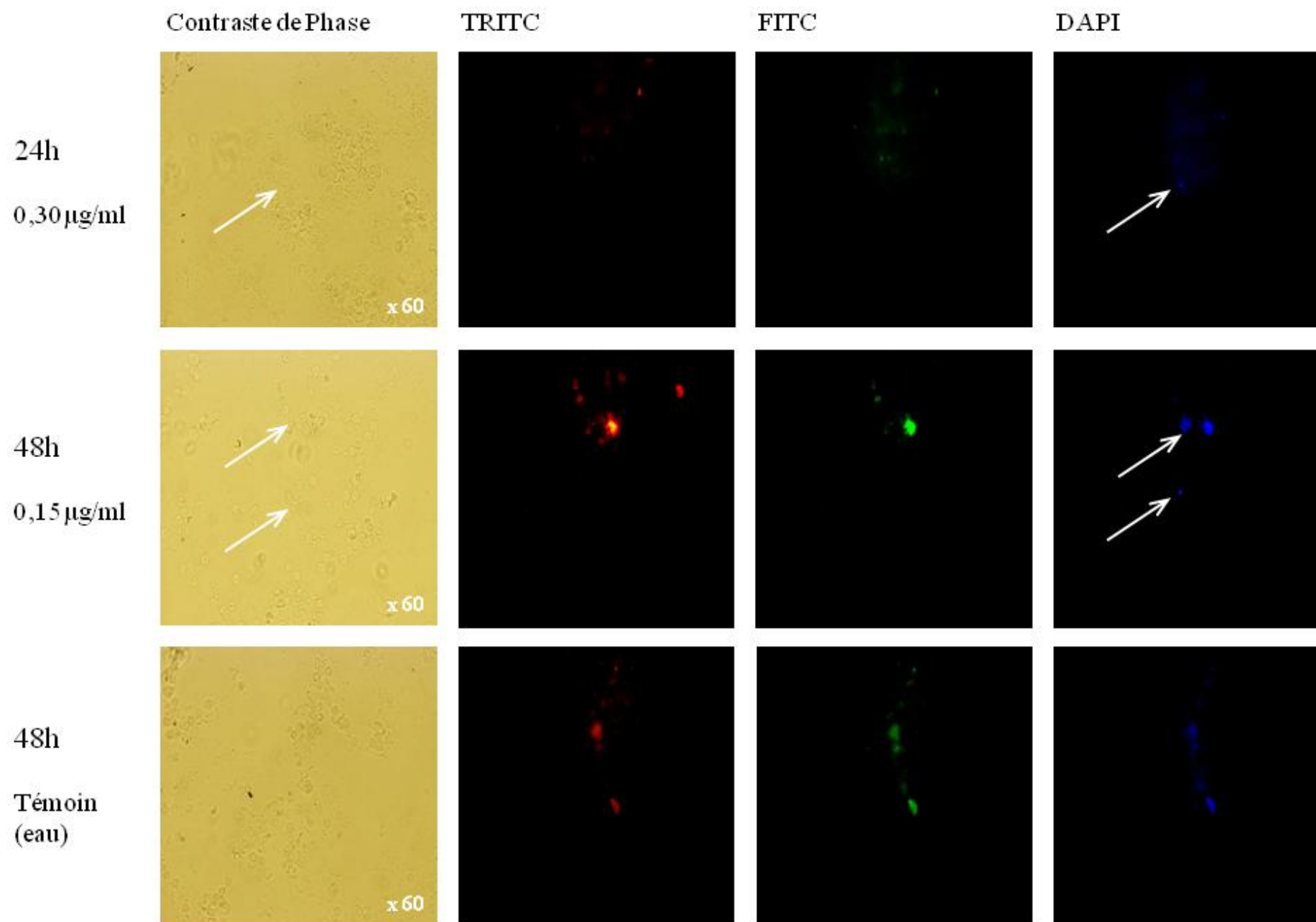


Fig.22 Thymocytes après incubation en présence de BI CBi0703_{BC} marqué par le Pacific Blue. Les flèches montrent les cellules présentant une fluorescence spécifique pour le Pacific Blue.

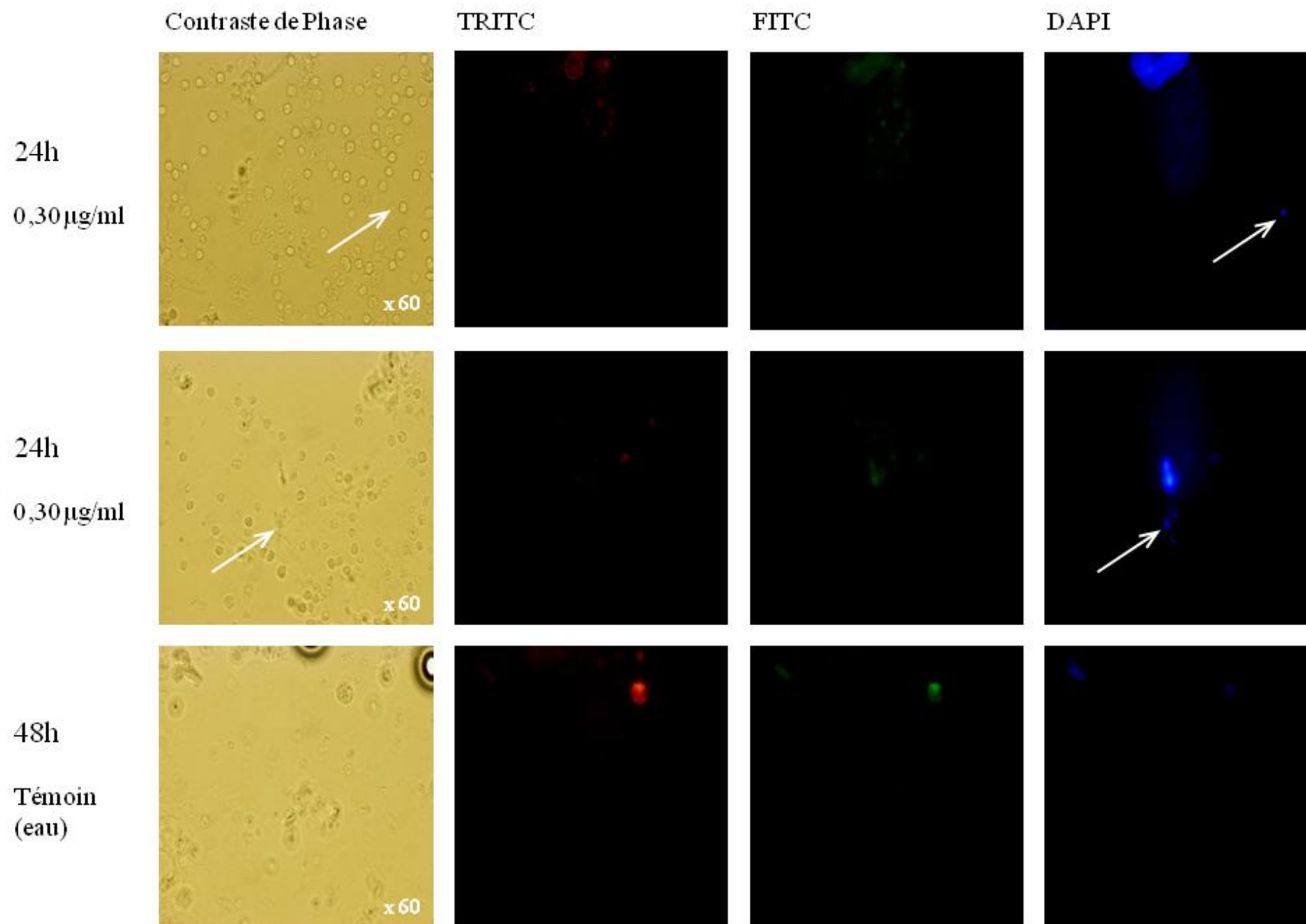


Fig.23 Cellules de moelle osseuse après incubation en présence de B1 CBi0703_{BC} marqué par le Pacific Blue. Les flèches montrent les cellules présentant une fluorescence spécifique pour le Pacific Blue.

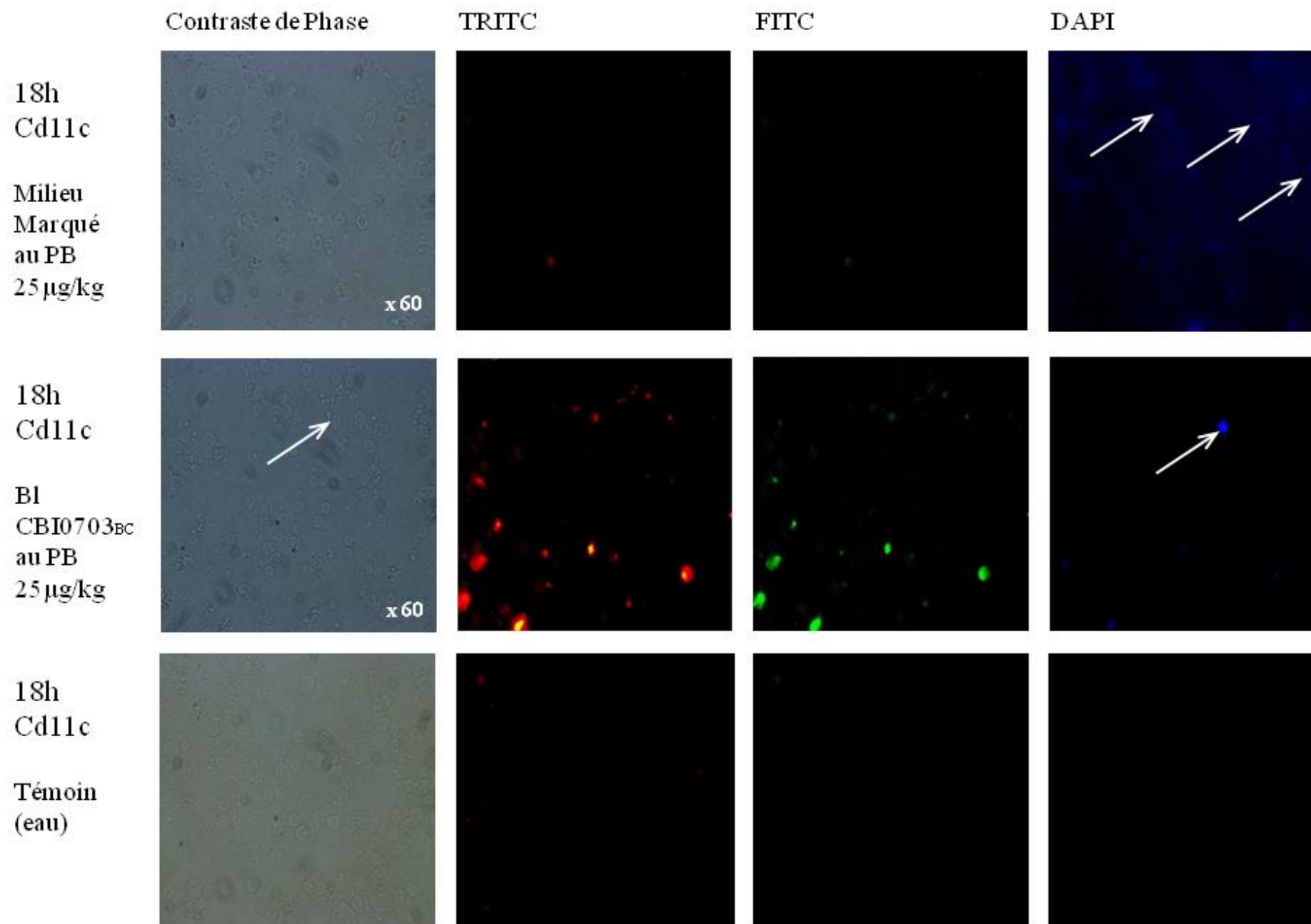


Fig.24 Cellules dendritiques de moelle osseuse 18h post-gavage de BI CBI0703_{BC} , Milieu marqué par le Pacific Blue ou de l'eau. Les flèches montrent les cellules présentant une fluorescence spécifique pour le Pacific Blue.

3.3.3.2 Analyse par FACs

A l'issu de la première analyse par microscopie, une deuxième méthode de détection est tentée afin de balayer plus de cellules après gavage par une concentration égale voire supérieure d'agrégats bifides.

Une première analyse avec des doses d'agrégats ou d'extrait à 50 µg/kg montre qu'à l'instar des observations par microscopie, le nombre des cellules de la moelle osseuse fluorescentes est supérieur au contrôle recevant de l'eau uniquement dans le cas de l'extrait du milieu (différence > 2% de cellules) (Fig. 25). L'administration d'agrégats bifides ne modifie pas le taux de cellules présentant une fluorescence par rapport au témoin.

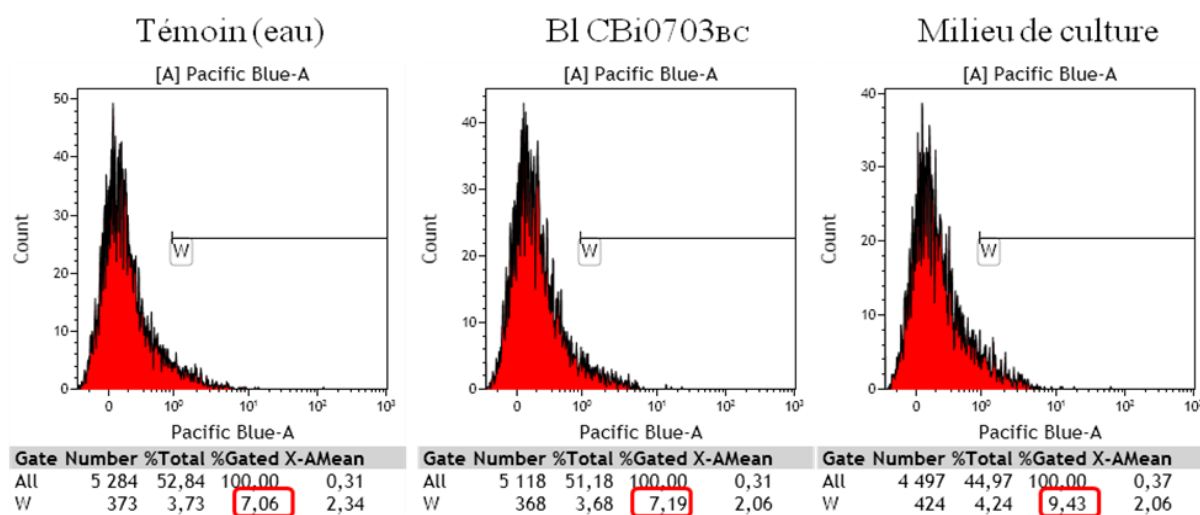


Fig. 25 : Analyse de la fluorescence des suspensions cellulaires de moelle osseuse. Les pourcentages de cellules émettant une fluorescence Pacific Blue sont encadrés en rouge.

Pour s'assurer de la capture possible des agrégats bifides, une dose supérieure est administrée (100µg/kg). Les résultats de l'analyse par FACS sont exprimés en % de cellules émettant de la fluorescence bleue rapporté soit à la population totale, soit aux sous-populations caractérisées par leur taille et granulométrie (A, B, C) (Fig. 26).

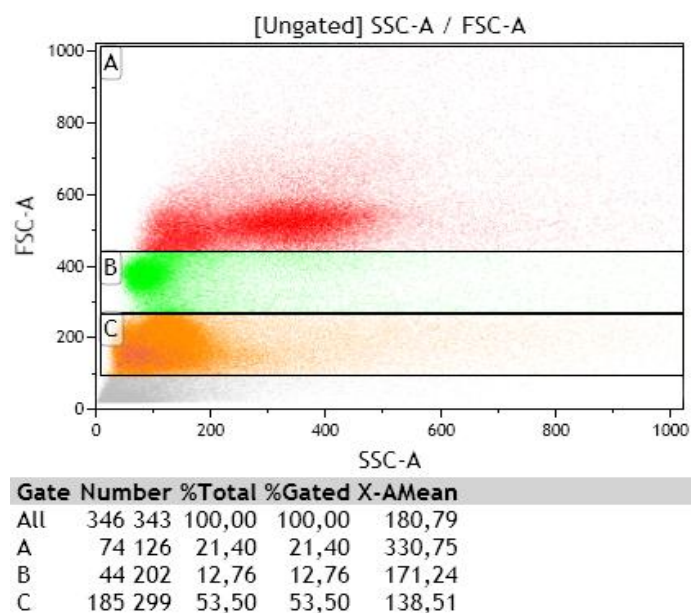


Fig. 26 : Taille/structure de la suspension totale de moelle osseuse d'une souris ayant reçu les agrégats bifides à 100µg/kg. FSC (Forward Scatter)= taille relative des cellules ; SSC (Side Scatter)= granularité relative ou complexité interne. Taille population A> Taille population B> Taille population C.

Les résultats de l'analyse en FACS correspondant aux pourcentages de cellules positives en Pacific Blue sont présentés dans le tableau 11.

	Témoin (eau)	BICBi _{BC} -15h post challenge	BICBi _{BC} -72h post challenge	P [*]
N ^a	7	5	4	
Suspension totale	0,14 ± 0,07	0,17 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,024
Population A	0,46 ± 0,05	0,76 ± 0,05	0,45 ± 0,1	0,046
Population B	0,84 ± 0,09	0,95 ± 0,08	0,80 ± 0,13	NS

^a : Nombre d'échantillons testés (deux essais ont été exclus car l'autofluorescence des suspensions témoins était hors de l'intervalle de confiance)

* test de Kruskal Wallis

NB : La population C n'a pas été analysée car elle correspond à des débris ou cellules morte (petite taille/ granulosité faible)

Tableau 11 : Analyse des suspensions cellulaires de moelle osseuse présentant une fluorescence bleue par cytométrie de flux.

On remarque une augmentation transitoire du nombre de cellules fluorescentes 15h après gavage mais non significative en comparaison avec le groupe témoin. Par contre, l'effondrement ultérieur est statistiquement significatif entre les deux temps ($p=0.006$). Et le taux de cellules positives dans le groupe Bl CBi0703_{BC}-72h post-challenge tend à être inférieur à celui observé chez les souris témoin ($p=0.034$).

L'expression de fluorescence est retrouvée dans les deux sous-populations A et B. L'augmentation de la fluorescence est particulièrement marquée 15h post-challenge dans la sous-population A mais est insuffisante pour observer une différence significative.

Tri des cellules CD11c sans pré-tri par le système Miltenyi

Le tableau 12 reprend les résultats obtenus après tri des cellules CD11c+. Les résultats sont exprimés en % de cellules CD11c+. Deux catégories de cellules sont présentées : les cellules CD11c+ ne présentant pas de fluorescence bleue (PB-), et les cellules CD11c+ fluorescentes (PB+).

	Témoin (eau)	BlCBi _{BC} -15h post challenge	BlCBi _{BC} -72h post challenge	p*
N ^a	5	4	4	
Population A				
CD11c+ PB+	-0,03 ± 0,14	-0,14 ± 0,19	0,06 ± 0,14	NS
CD11c+ PB-	3,82 ± 1,59	3,59 ± 1,66	3,24 ± 1,35	NS
Population B				
CD11c+ PB+	0,01 ± 0,03	-0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,08	NS
CD11c+ PB-	3,02 ± 0,36	3,21 ± 0,75	3,42 ± 0,67	NS

^a : Nombre d'échantillons testés (variabilité due à leur inclusion ou non dans l'intervalle de confiance)

* Kruskal Wallis avec post-hoc Coroner (correction Bonferroni)

Tableau 12 : Analyses des cellules dendritiques Cd11c+ présentant une fluorescence bleue.

Les valeurs négatives signifient que la réponse après sélection avec les isotypes est plus intense. En fait, le tri des cellules représente un stress qui stimule l'autofluorescence de l'échantillon. Les cellules dendritiques Cd11c+ montrant une fluorescence spécifique au Pacific blue ne sont pas plus nombreuses 15 et 72h après gavage par les agrégats bifides.

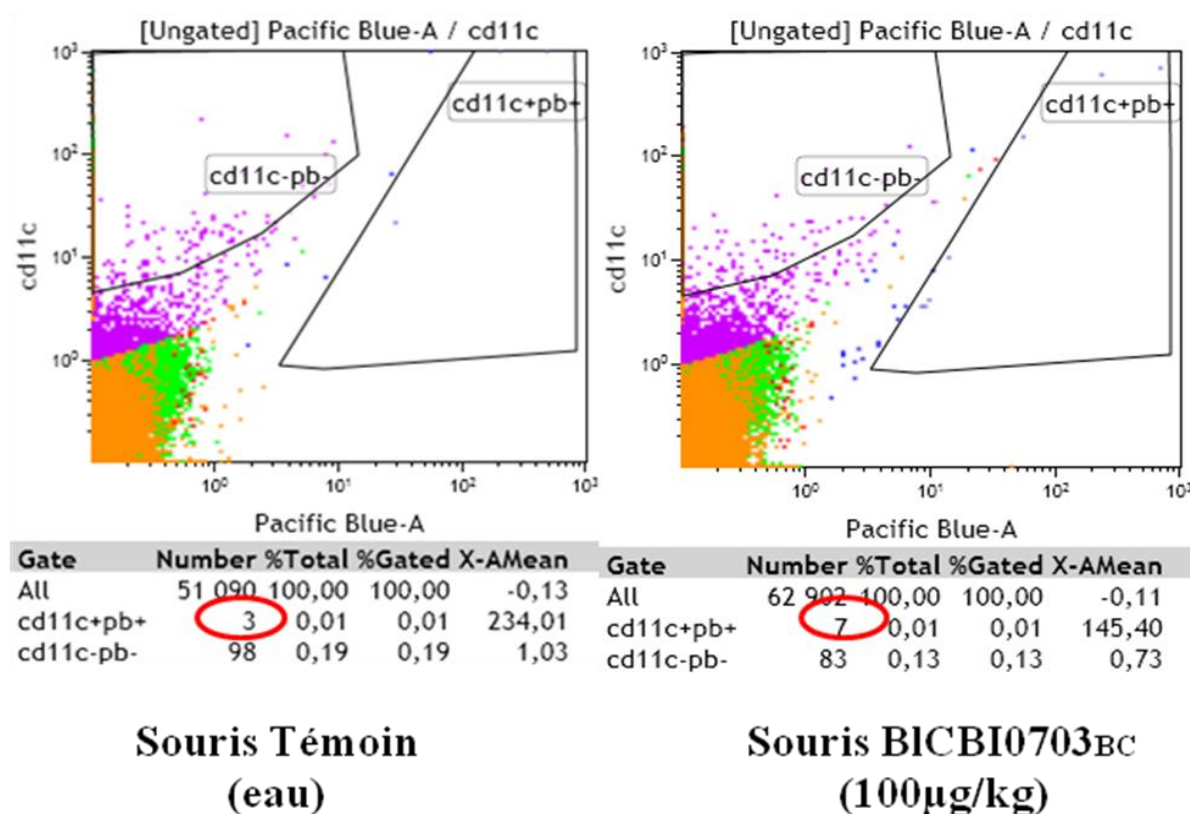


Fig. 27 : Cellules CD11c+ sélectionnées par le système Miltenyi émettant une fluorescence bleue.

Pré-tri des cellules CD11c+ par le système Miltenyi

Après sélection par le système Miltenyi, on détecte très peu de cellules dendritiques Cd11c+ par Facs, probablement parce que l'anticorps dédié au tri cellulaire reconnaît les épitopes masqués par l'anticorps utilisé pour la sélection positive. Parmi les cellules Cd11c+ triées, quelques unes montrent une fluorescence positive mais le taux de cellules ne varie pas de façon significative entre les groupes de souris traitées ou non par les agrégats bifides (Fig. 27). Ces résultats corroborent les observations en microscopie montrant de rares cellules

émettant une fluorescence dans le bleu après contact direct avec les cellules de la moelle osseuse.

En conclusion, le tri par cytométrie de flux bien que permettant d'analyser des populations cellulaires plus grandes que celles observées par microscopie, n'a pas permis de détecter un nombre important de cellules émettant dans les longueurs d'onde du Pacific Blue après gavage avec les agrégats bifides. Seule une faible augmentation transitoire est observée dans la population de grandes cellules de la moelle osseuse (population A). Par contre, on ne retrouve pas de différence après tri des cellules de la population A.

A l'inverse, même sans présélection cellulaire, on confirme la capture des agrégats du milieu de culture à partir de l'intestin et leur circulation vers la moelle osseuse.

On peut donc penser que la faible augmentation de cellules fluorescentes dans la moelle osseuse de souris traitées par de fortes concentrations en agrégats résulte d'une contamination plus importante en agrégats du milieu de culture. On ne peut donc pas conclure à la capture des agrégats bifides. Par contre, on confirme que la co-agrégation lipoprotéines bifides et protéines du lait empêche majoritairement la capture des agrégats de protéines.

3.3.4 Capture des bifidobactéries mortes alimentaires

Au cours du procédé de purification des complexes bifides, l'élimination des bifidobactéries mortes n'est pas complète. Ainsi des résidus d'acides nucléiques bifides restent présents dans les agrégats BI CBi0703_{BC}. Nous avons donc recherché par PCR la présence de résidus nucléiques des complexes bifides grâce à des amorces spécifiques dans différents organes murins 8h après gavage de 4 souris à une dose de 50µg/kg équivalente à 200 UFC de BI CBi0703.

Le message nucléique spécifique des complexes bifides BI CBI0703CBI_{BC} a été détecté dans les 3 fractions de l'iléon : I1 (3/4 souris), I2 (3/4 souris), I3 (1/4 souris), dans le *caecum* (1/4 souris), et dans les plaques de Peyer (1/4 souris). En revanche, aucun signal (0/4 souris) n'a été détecté dans le côlon, dans les cellules dendritiques Cd11c+ isolées de moelle osseuse, de rate et de poumon.

En conclusion, le message spécifique des agrégats BI CBI0703_{BC} à 18h post gavage est détecté exclusivement dans l'intestin (iléon, caecum) et dans les plaques de Peyer. Ces résultats indiquent que les bifidobactéries mortes inoculées à très faible dose sont reconnues par les cellules phagocytaires des plaques de Peyer contrairement aux agrégats bifides. Par contre, il semble ne pas y avoir de recirculation des cellules dendritiques car elles ne sont pas retrouvées dans la moelle osseuse, la rate et le poumon. Mais on ne peut éliminer la possibilité que les cellules dendritiques dégradent l'ADN bactérien avant d'atteindre les organes.

3.3.5 Translocation bactérienne

Nous évaluons dans cette partie la prévention du passage de bactéries viables à travers le tube digestif. Comme la capture des agrégats bifides ne semble pas possible à partir de l'intestin, on peut se poser la question de leur rôle intra-intestinal. Pour ce faire nous vérifions si par supplémentation intra-intestinale en agrégats bifides, il est possible de prévenir ou retarder le passage des bactéries intestinales.

Deux lignées de souris ont été utilisées car les portages de bactéries aérobies varient selon les souches murines.

Chez les souris C57-BL/6, le portage intestinal en entérocoques, en particulier *E. faecalis*, est conséquent. On observe une contamination des baignoires dans lesquels baignent les fractions

intestinales, qui apparaît dans les trois heures s'il n'y a pas eu injection d'agrégats dans les pièces iléales. La contamination augmente au cours du temps, indiquant le passage d'entérocoques vivants de la lumière intestinale vers le milieu intérieur (Fig. 28). L'injection d'agrégats bifides ralentit et diminue le passage.

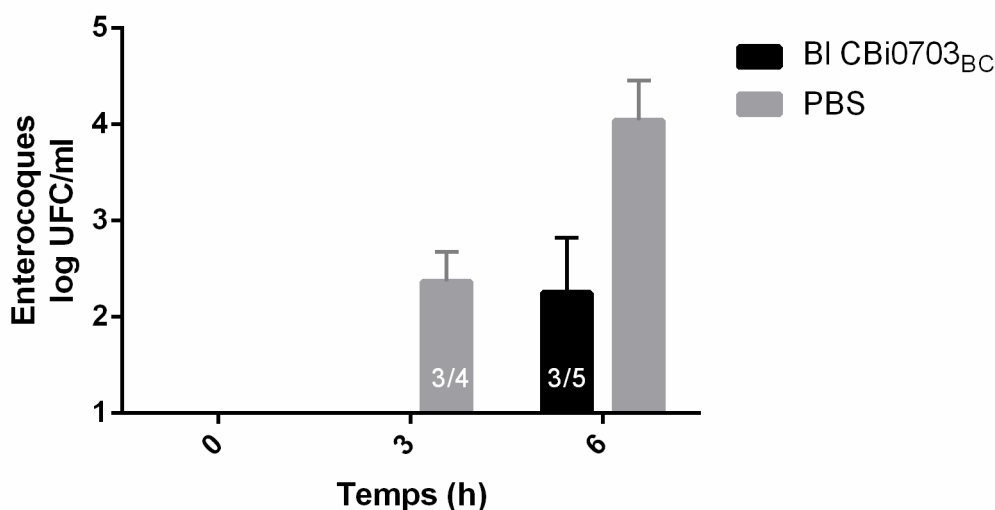


Fig. 28 : Passage des entérocoques vivants de la lumière intestinale vers le milieu intérieur. A T3h, on observe une translocation des entérocoques uniquement dans les fractions supplémentées en PBS (3 fragments sur 4). A T6h, Les entérocoques vivants sont retrouvés dans le milieu des fractions supplémentées en PBS (4/4) avec un taux supérieur à 4 log UFC/ml alors que pour le fractions supplémentées avec les agrégats ils sont présents uniquement dans 3 fractions sur 5 et sont inférieurs à 3 log UFC/ml.

Chez les souris CD1, le portage n'est pas suffisant pour observer un passage important d'entérocoques. Par contre, on peut analyser le passage des lactobacilles. La contamination par *Lactobacillus johnsonii* augmente au cours du temps mais reste limitée à partir des pièces d'iléon proximal s'il y eu injection d'agrégats (Fig. 29, Annexe V). Par contre, *L.reuteri* montre un passage plus aléatoire avec une survie faible des bactéries ayant traversé l'iléon.

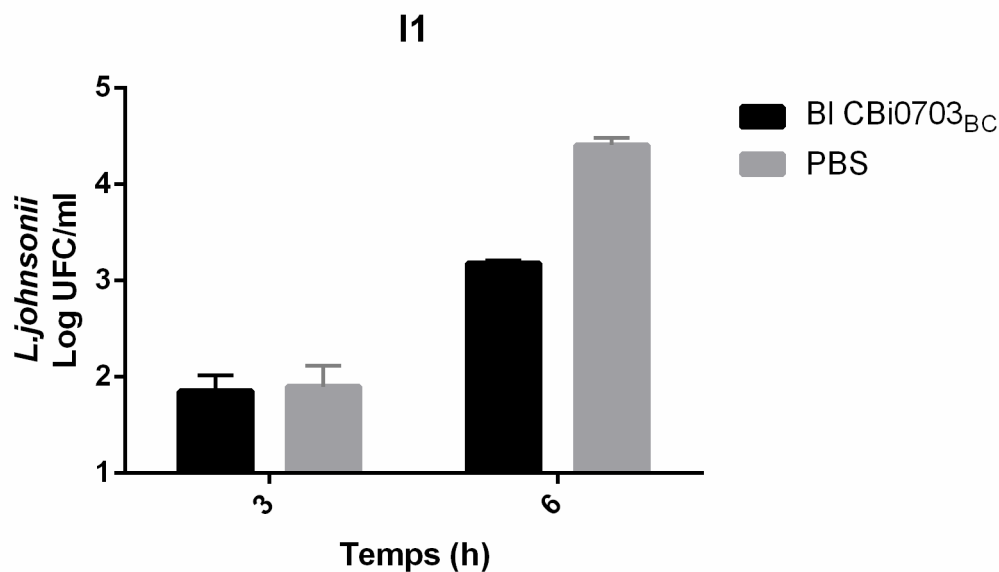


Fig. 29 : Translocation de *L.johnsonii* en partie haute de l'iléon. A T3h, le taux de *L.johnsonii* ayant transloqué est sensiblement le même quelque soit la supplémentation. Par contre, à T6h, la quantité de *L.johnsonii* est limitée dans les fragments supplémentés en agrégats bifides par rapport au PBS.

A l'instar des entérocoques, les entérobactéries traversent lentement l'iléon. Les baignoires de seulement trois pièces montrent une contamination par *E.coli* dans les trois heures. A 6 heures, le nombre augmente (9/16 pièces) sans qu'il soit possible de distinguer un effet du traitement.

Bien que ce modèle ne reflète pas les conditions naturelles intestinales (pression osmotique, équilibre des flux, péristaltisme...), il permet néanmoins de confirmer que les agrégats bifides peuvent affecter la vitesse ou le taux de passage iléal de certaines bactéries comme entérocoques et lactobacilles.

3.4 Discussion

Eu égard aux résultats de microscopie et de cytométrie, il est peu probable que l'activité des agrégats bifides passe par une capture par les cellules dendritiques ou uniquement à des taux

très faibles. Par contre, la prévention de la capture d'agrégats protéiques peut présenter un intérêt en santé publique. En effet, de nombreux agrégats protéiques sont formés lors de procédés d'apertisation, de séchage alimentaire, etc... Ces agrégats solubles peuvent être capturés par le système immunitaire. Ainsi, ils pourraient participer aux phénomènes d'allergisation et pourraient constituer un risque de déclenchement DT1 (Jo et al., 2014; Lamb et al., 2015; Luopajarvi et al., 2008).

Au contraire des agrégats, les bifidobactéries mortes bien que détectées presque exclusivement dans l'intestin après gavage des souris semblent reconnues par les cellules de l'immunité puisque nous retrouvons un signal bifide dans les plaques de Peyer. Ce phénomène a été observé avec des bifidobactéries marquées par le CFSE (Hiramatsu et al., 2011).

La capture de bifidobactéries mortes au contraire des agrégats pourrait s'expliquer par la différence de reconnaissance par les TLRs. L'absence de reconnaissance par le TLR6 des agrégats BI CBi0703_{BC} pourrait affecter les premières étapes de la phagocytose. La bicouche phospholipidique cellulaire est organisée en microdomaines qui peuvent inclure des protéines comme les TLRs (Triantafilou et al., 2011).

Ainsi, le TLR2 et le TLR6 forment un hétérodimère à la surface cellulaire. Lors de la stimulation avec un ligand, les hétérodimères sont recrutés dans des microdomaines appelés « radeaux lipidiques » et s'associent avec d'autres protéines résidentes dans le microdomaine telles que CD14 et CD36. La liaison d'un produit bactérien approprié conduit à un changement de conformation dans le radeau lipidique et à l'activation de cascades de signalisation intracellulaire qui mènent à la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire du NF- κ B (Triantafilou et al., 2011).

On peut penser qu'en absence de reconnaissance entre agrégats et TLR6, les changements de conformation nécessaires au déclenchement de l'invagination de la membrane cellulaire ne sont pas déclenchés (Fig. 30) (Aigal et al., 2015).

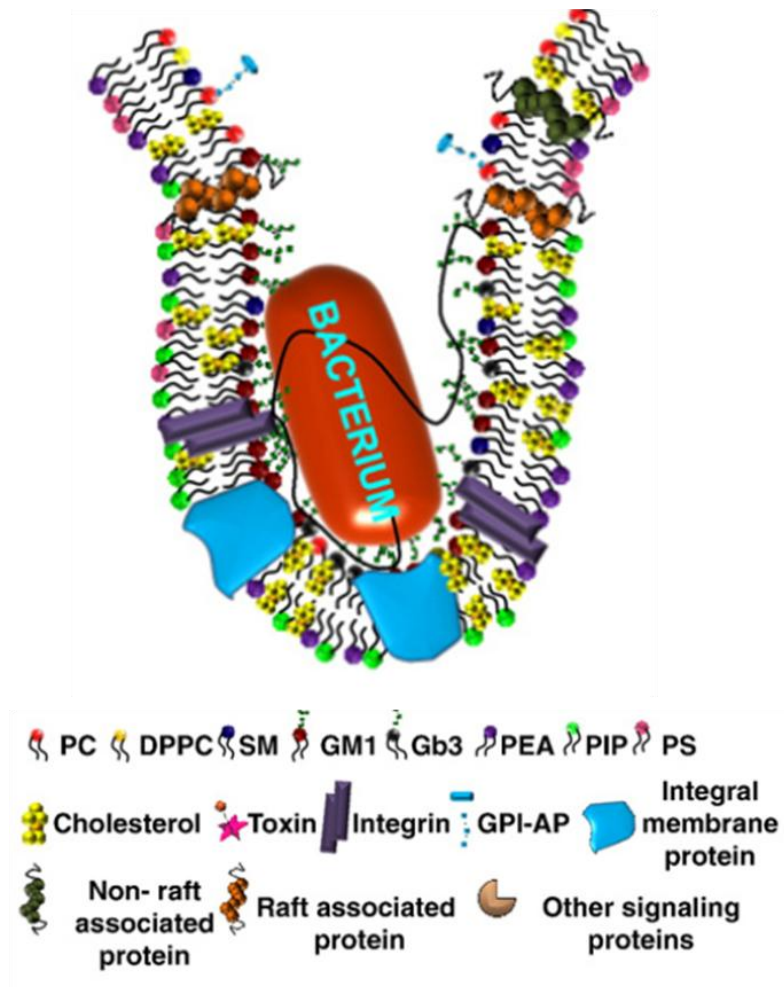


Fig. 30 : Invagination de la membrane plasmique cellulaire induite par une reconnaissance ligand récepteur entre la bactérie et la cellule. D'après (Aigal et al., 2015).

Nous avons vu que les agrégats de BI CBi0703_{BC} exposent à leur surface principalement des sucres et des hexosamines. Il est donc probable qu'ils interagissent avec l'hôte via les glycanes exposés en surface. En effet, les récepteurs de type lectines reconnaissant des ligands de type glycane sont largement exprimés par les cellules intestinales. Parmi ces lectines, les galectines sont impliquées dans nombreuses interactions microbiote/hôte et dans de nombreux processus physiologiques. Des travaux antérieurs de l'équipe ont déjà montré que la translocation bactérienne est réduite lorsque l'intestin est largement colonisé par les bifidobactéries. Cette réduction est associée à une diminution de l'expression des galectines

dans les organes extra-intestinaux (Romond et al., 2009). Dans le chapitre 2, nous avons montrés que les composés BICBI0703_{BC} sont reconnus par la galectine 1 via les hexosamines et galactoses exposés en surface. Ces lectines peuvent favoriser l'adhésion de certains micro-organismes à la surface des cellules de l'hôte (Baum et al., 2014). Par ailleurs, la galectine-1 est capable de se fixer à la mucine et aux glycanes exprimés en surface des cellules épithéliales intestinales (Wasano & Hirakawa, 1997).

Deux principales hypothèses pourraient expliquer l'activité de ces agrégats bifides en empêchant l'adhésion de certaines bactéries aux cellules de l'intestin. La première est basée sur leur capacité à entrer en compétition avec certaines bactéries du microbiote intestinal en bloquant les sites de reconnaissance de la galectine-1 via leurs glycanes exposés en surface (Fig. 31). La seconde hypothèse serait que ces agrégats bifides agissent comme inhibiteurs de certaines lectines bactériennes (Fig. 32).

Nous avons vu que le passage d'*E.faecalis* était diminué après injection des agrégats. Or la capacité de translocation semble liée à la synthèse du polysaccharide EPA (Zeng et al., 2004). L'analyse du polysaccharide EPA purifié montre la présence de rhamnose, glucose, galactose, GalNAc, and GlcNAc, donc potentiellement reconnaissable par la galectine-1 (Teng et al., 2009). On peut imaginer que le blocage des galectine-1 par les agrégats pourrait empêcher la fixation des entérocoques.

Dans le cas des lactobacilles, il est possible que la deuxième hypothèse explique la moindre translocation observée après 6h d'incubation en présence d'agrégats. Des lectines reconnaissant le mucus sont décrites chez les lactobacilles (Neeser et al., 2000; Van Tassell & Miller, 2011). On peut imaginer que les agrégats bifides peuvent venir se fixer sur les lectines bactériennes empêchant leur fixation ultérieure aux cellules intestinales.

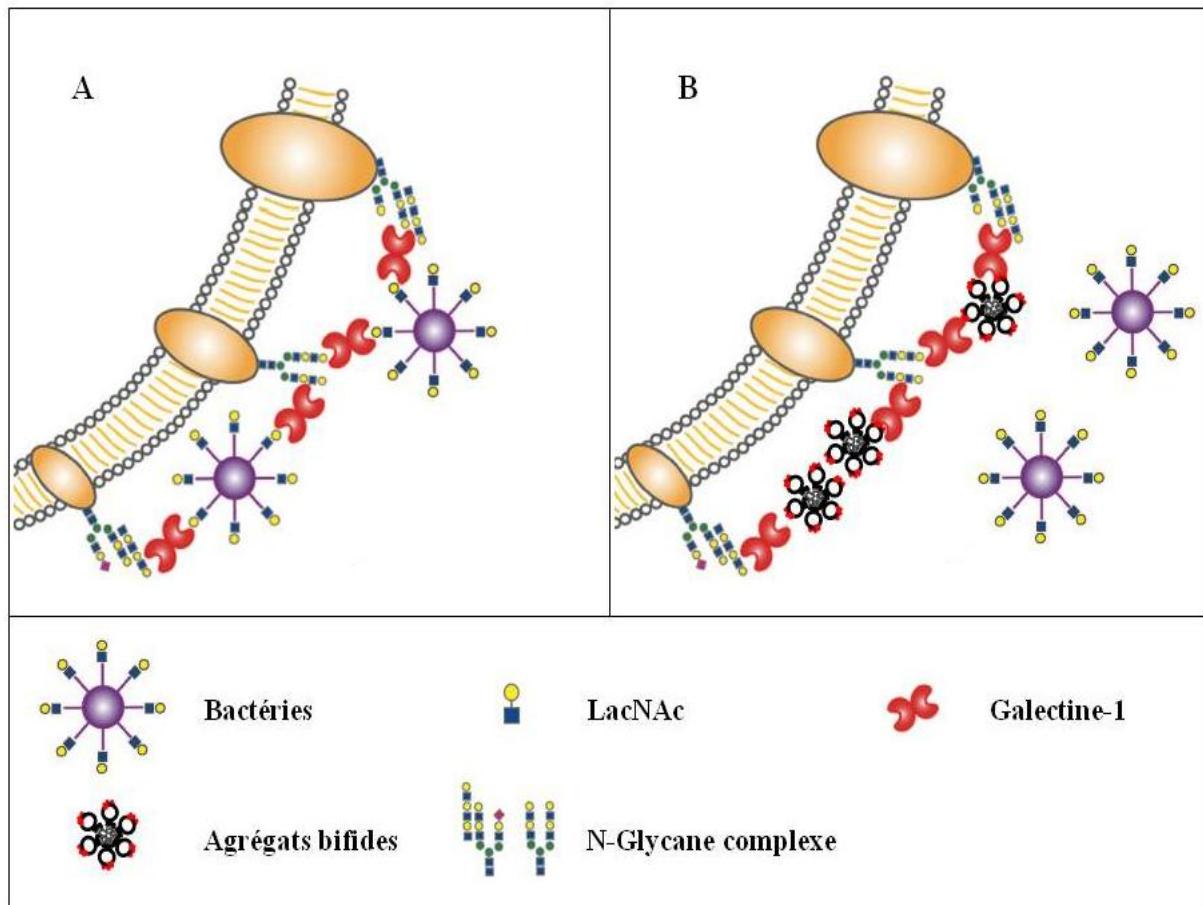


Fig. 31 : Illustration de l'hypothèse du mécanisme d'action des agrégats bifides via l'interaction avec la galectine 1. (A) La galectine 1 permet l'adhésion de bactéries à la surface des cellules épithéliales intestinales via leurs glycanes ; (B) Saturation des sites de reconnaissance des galectines avec les agrégats bifides empêchant l'adhésion des bactéries à la surface cellulaire. Adaptée de.(Baum et al., 2014)

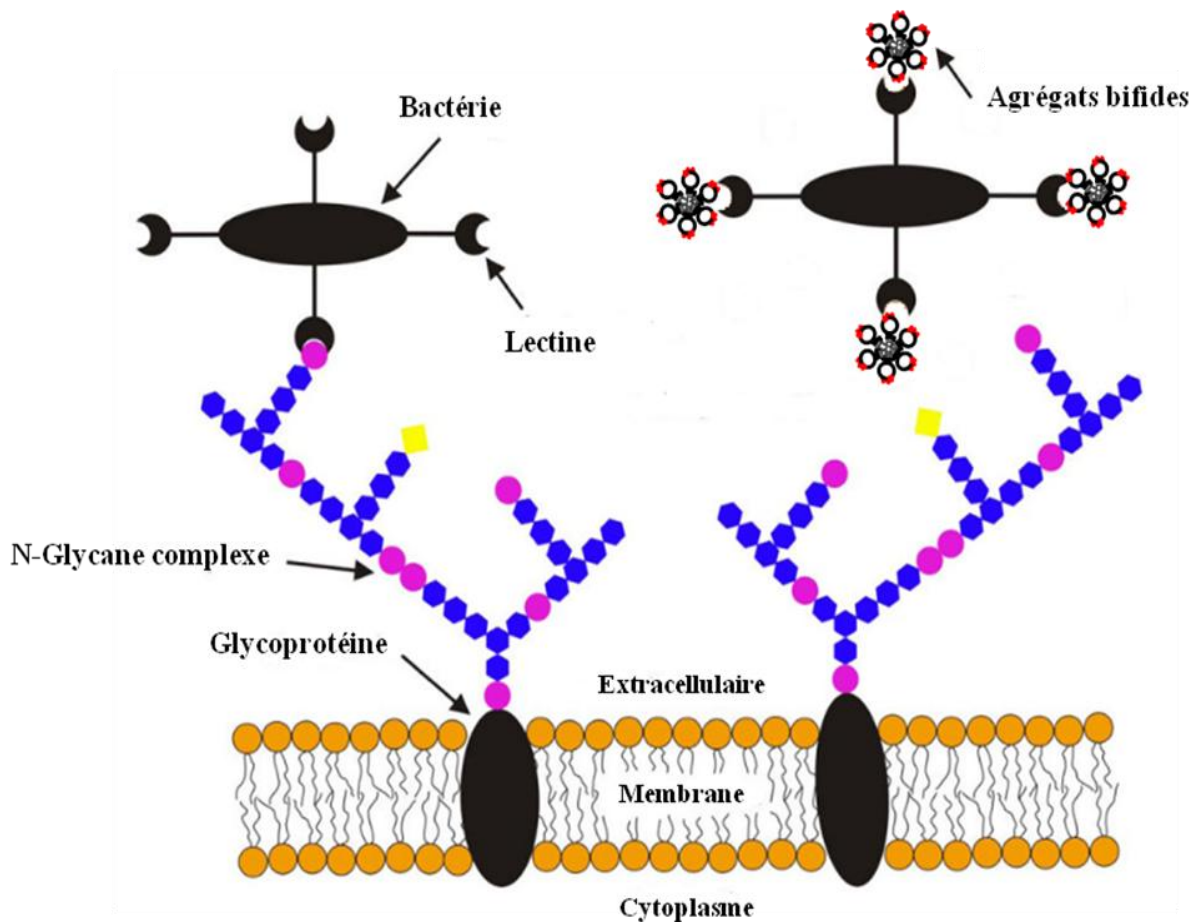


Fig. 32 : Illustration de l'hypothèse du mécanisme d'action des agrégats bifides via l'interaction les lectines bactériennes. (A) Les lectines bactériennes permettent l'adhésion de bactéries à la surface des cellules épithéliales intestinales via leurs glycanes ; (B) Saturation des sites de reconnaissance des lectines bactériennes avec les agrégats bifides empêchant l'adhésion des bactéries à la surface cellulaire. Adaptée de (Ghazarian et al., 2011).

CHAPITRE 4 : Recherche des agrégats bifides dans le lait maternel et efficacité anti-diabétique dans le modèle NOD

4.1 Objectifs

Une étude antérieure réalisée au sein de l'E A3610 a montré que l'administration d'un pool de lait maternel (LF) réduit significativement l'incidence du DT1 chez des souris NOD (Sané, 2012). La dose quotidienne moyenne de *Bifidobacterium* (en particulier *B.longum*) délivrée par le lait maternel était estimée par méthode moléculaire à environ 4.3 log UFC par jour et par souris. Or les bifidobactéries étaient mortes, la recherche par culture étant négative. A la fin des essais, on notait l'absence de cocci dans les plaques de Peyer chez les souris traitées par le lait de femme. Eu égard aux résultats préliminaires présentés dans le chapitre 3, on peut penser que les bifidobactéries jouent un rôle :

- soit par capture des bifidobactéries mortes
- soit par l'intermédiaire des lipoprotéines potentiellement sécrétées par les bifidobactéries dans le lait de femme.

Cependant, le taux faible de bifidobactéries dans le pool testé rend difficilement quantifiable les lipoprotéines potentiellement libérées. Il est donc nécessaire de sélectionner des échantillons de lait de femme les plus concentrés en bifidobactéries. Mais préalablement à l'extraction des lipoprotéines bifides potentiellement libres dans le lait maternel, il est nécessaire de vérifier si les agrégats bifides jouent un rôle dans la prévention du DT1.

Les objectifs de notre travail sont donc:

- d'analyser la distribution des espèces et la cinétique de détection des bifidobactéries dans le lait maternel
- de vérifier si des agrégats bifides administrés à des souris NOD préviennent le développement du DT1

4.2 Quantification des bifidobactéries et de leurs composés dans le lait maternel

4.2.1 Préambule

Le lait maternel est une source de bactéries commensales et probiotiques pour l'intestin du nouveau-né. Il est composé en majeure partie de staphylocoques, streptocoques, de bactéries lactiques et de bifidobactéries (Fernandez et al., 2013). En 2008, une étude espagnole sur 50 échantillons de lait maternel a montré que les bifidobactéries étaient présentes dans tous les échantillons en quantité moyenne de $3,63.10^3$ UFC/ml (Collado et al., 2009). Notre objectif est d'évaluer si les bifidobactéries sont retrouvées à la même fréquence dans le lait maternel de mamans du Nord-Pas de Calais. Dans un second temps, il s'agissait de déterminer si on retrouve dans le lait de femme le support génétique bifide codant pour les lipoprotéines secrétées précédemment décrites. A cet effet, le gène codant pour les lipoprotéines de *B.longum* a été recherché puis quantifié par qPCR.

4.2.2 Matériel et méthode

4.2.2.1 Echantillons

Les échantillons de lait proviennent du Lactarium Régional de Lille (Hôpital Jeanne de Flandre - CHRU de Lille, France). L'étude est réalisée en respectant les règles du comité d'éthique local. Les consentements éclairés des 16 donneuses incluses dans l'étude ont été recueillis. Les échantillons de lait sont composés de colostrum (lait collecté entre J1 et J4 après accouchement), de lait de transition (J5 – J11). Chaque donneuse fournit du lait non pasteurisé. Chaque échantillon est aussitôt congelé à -20°C. Par ailleurs un échantillon de lait utilisé pour l'essai chez l'animal a été inclus dans le panel.

4.2.2.2 Extraction d'ADN à partir des échantillons de lait

Dans un premier temps, une fraction des échantillons de lait maternel (1 ml) est centrifugée à 11.000 g pendant 20 min. L'ADN total est extrait à l'aide du kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. L'ADN est élué dans 100µL de tampon AE (fourni dans le kit) et les extraits d'ADN purifiés sont conservés à -20°C.

4.2.2.3 Quantification par amplification génique en temps réel.

La quantification par qPCR est utilisée pour dénombrer les bifidobactéries présentes dans les échantillons de lait maternel. A cet effet, trois couples d'amorces sont utilisés (Tableau 13). Le premier couple cible le gène *xfp* (xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase) permettant la quantification du genre *Bifidobacterium* (Cleusix et al., 2010). Le second couple cible le gène *B11181* codant pour la lipoprotéine sécrétée par *B.longum* CBi0703. Le troisième couple est spécifique de *B.breve* et cible la séquence d'ADNr16S (Mullie et al., 2003). Les amorces sont synthétisées par Eurogentec. Chaque mélange

réactionnel de 25µl est composé de PCR Master Mix (Thermo Scientific) contenant 0,625 Unités d'ADN Taq polymérase ThermoPrime, de 1,5 mM de chlorure de magnésium, de 0,2 mM de dNTP, de 75 mM Tris-HCl, de 0,01% de Tween 20 ®, de 0,5µM de chaque amorce et de 5µl d'ADN. Les réactions d'amplification génique sont réalisées dans un thermocycleur de type Mastercycler ® ep realplex (Eppendorf). L'activation de l'enzyme à 95°C pendant 15 minutes est suivie par 40 cycles incluant une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, puis une hybridation des amorces pendant 30 secondes, à une température entre 63 et 65°C en fonction du type d'amorces utilisées, suivie d'une étape d'extension à 72°C pendant 1 min,. Une analyse de la courbe de dénaturation thermique est ajoutée au programme pour déterminer la spécificité de l'amplicon. Ces produits de PCR sont également déposés sur gel d'agarose 2% pour vérifier leur taille.

Séquence (5'-3')	Gène cible	Taille de l'amplicon (pb)
Xfp Fw: CGCTTGTCGAATTCCTTCTT	xfp	232
Xfp Rv: AGTTCCAGAAGGAGCAGCAG		
BL1181Fw: CCAGCTGCTGCTTGAGTTC	CHAP domain	84
BL1181 Rv: GCAGACACCTATTCCGACCT		
B.breve Fw: GGGAGCAAGGCACTTTGTGT	ADNr 16S	568
B.breve Rv: GAAACCCCATCTCTGGGATC		

Tableau 13 : Couples d'amorces utilisés pour quantifier les bifidobactéries dans les échantillons de lait maternel.

4.2.2 Résultats

Lors de la collecte, 33 échantillons donnés par 16 mamans différentes sont recueillis entre le premier et le 11e jour après accouchement. Parmi ces échantillons, 19 correspondent à du colostrum (J1 à J4 après accouchement) et 14 à du lait de transition (J5 à J11). Les résultats des différentes quantifications sont présentés dans la figure 33.

Il en ressort que deux échantillons correspondant à 2 mamans sur 16 sont dépourvus de bifidobactéries (mamans n°14 et n°16). Chez les mamans dont le lait présente des bifidobactéries, la quantité en *Bifidobacterium spp.* varie entre $1,08.10^2$ UFC/ml (Maman 13 à J+7) et $4,52.10^5$ UFC/ml (Maman 1 à J+3). On observe une instabilité de la population de bifides au cours temps dans la plupart des échantillons de lait. Cette instabilité est particulièrement marquée dans l'échantillon de lait de la maman N°8, on observe une variation des taux de bifides supérieure à 2 log UFC/ml entre J8 ($2,99 \log$ UFC/ml) et J11 ($5,8 \log$ UFC/ml).

Le gène codant pour la lipoprotéine de *B.longum* CBi0703 est amplifié dans 21 échantillons sur 33 et chez 12 mamans sur 16. Par contre, on remarque que les variations peuvent être plus conséquentes que celles observées pour les dénombrements des bifidobactéries totales. Ainsi, dans le lait de la maman 1, il n'y a pas de détection de *B.longum* à J2 et J4 et au contraire, la détection dépasse 10^4 UFC/ml en J3. De même chez la maman 5, on dénombre plus de 10^3 UFC/ml en J1 et J2 puis on observe un effondrement de *B.longum* en J4 (non détectable) suivi d'un retour à plus de 10^3 UFC/ml en J6 et de nouveau un effondrement en J8. On remarque que les jours où l'espèce *B.longum* n'est pas détectable (J4 et J8), on dénombre un taux de bifidobactéries totales élevé ($>10^5$ UFC/ml) dans le lait de cette maman. Ainsi, les variations de la quantité de *B.longum* ne sont pas associées à la maturation du lait entre colostrum et lait de transition.

Il est important de noter que la quantité de *Bifidobacterium spp.* est toujours supérieure à la quantité de *B.longum* ce qui suggère la présence d'autre espèces de bifides. Par ailleurs, l'espèce *B.breve* n'a pu être détectée que dans deux échantillons (maman n°6 à J+8, maman n°12 à J+3). Il serait donc intéressant de rechercher si d'autres espèces de bifidobacteries telles que *B.catenatulum* ou *B.animalis* (Gueimonde et al., 2007), retrouvées fréquemment dans le lait maternel et potentiellement capables de produire des lipoprotéines bifides (analyse *in-silico* chapitre 2) sont présents dans ces laits.

Par ailleurs l'échantillon du pool de lait utilisé dans l'essai d'efficacité contient $9,32.10^4$ UFC bifidobactéries/ml de lait dont $6,54.10^3$ UFC/ml de *B.longum* possédant le gène codant pour la lipoprotéine. L'espèce de *B.breve* n'a pas été détectée.

4.2.3 Conclusion

Les bifidobactéries sont retrouvées dans la majorité des échantillons de laits maternels (14/16) provenant de mamans du Nord-Pas de Calais. Le gène codant pour la lipoprotéine de *B.longum* est présent dans la plupart des échantillons de laits maternels et chez 12 mamans sur 16. Il en est de même pour le pool de lait utilisé dans l'essai d'efficacité.

Comme l'analyse transcriptomique indique que les lipoprotéines sont synthétisées de façon continue dans des milieux dérivés du lait, elles peuvent donc être sécrétées par les bifidobactéries dans le lait de femme, indépendamment du cycle de croissance et pourraient participer à la prévention du diabète de type 1 chez les souris NOD.

		Jour après la naissance										
		J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	J+8	J+9	J+10	J+11
Maman1	xfp B11181 B.breve		1,83E+05 ND ND	4,52E+05 1,06E+04 ND	2,70E+04 ND ND	7,56E+04 8,78E+02 ND						
Maman2	xfp B11181 B.breve	4,88E+04 5,92E+02 ND	5,74E+03 5,62E+02 ND									
Maman3	xfp B11181 B.breve		3,39E+04 2,72E+02 ND	5,19E+03 9,96E+02 ND								
Maman4	xfp B11181 B.breve				2,70E+03 5,56E+02 ND							
Maman5	xfp B11181 B.breve	5,94E+04 3,39E+03 ND	1,31E+04 1,02E+03 ND		1,27E+05 ND ND		6,79E+03 2,44E+03 ND		2,44E+05 ND ND			
Maman6	xfp B11181 B.breve								5,45E+04 ND DéTECTABLE			
Maman7	xfp B11181 B.breve				5,69E+04 1,50E+03 ND							
Maman8	xfp B11181 B.breve								9,82E+02 ND ND		1,12E+05 1,56E+04 ND	2,43E+05 2,39E+04 ND
Maman9	xfp B11181 B.breve		1,07E+05 8,29E+03 ND	1,11E+05 1,73E+03 ND		9,51E+04 1,18E+04 ND	3,74E+04 ND ND					
Maman10	xfp B11181 B.breve					4,74E+02 4,05E+02 ND	1,59E+04 4,03E+02 ND					
Maman11	xfp B11181 B.breve			4,35E+04 ND ND								
Maman12	xfp B11181 B.breve			3,66E+04 3,93E+02 DéTECTABLE								
Maman13	xfp B11181 B.breve						2,10E+03 5,51E+02 ND	1,08E+02 ND ND				
Maman14	xfp B11181 B.breve				ND ND ND							
Maman15	xfp B11181 B.breve	1,76E+04 3,75E+02 ND	9,47E+03 ND ND									
Maman16	xfp B11181 B.breve							ND ND ND				

Fig. 33 : Quantification des bifidobactéries dans les échantillons de lait maternel. Les résultats sont présentés en UFC/ml de lait. Les quantifications des bifidobactéries totales, de l'espèce *B.longum* et de l'espèce *B.breve* sont indiquées respectivement en vert, rouge et bleu. ND = non détectable.

4.3 Efficacité des composés BI CBi0703_{BC} et modulation de la flore

4.3.1 Préambule

Eu égard aux concentrations de bifidobactéries sécrétrices du lait maternel, on peut estimer que le taux minimum de lipoprotéines bifides sécrétées sera de l'ordre de 1 à 3 µg par litre. Cependant, les essais réalisés dans les modèles d'arthrite montrant qu'en dessous de 10µg/L, les effets anti-inflammatoires ne sont pas observés, nous choisissons pour un premier essai d'essayer une dose de 0,2mg/L aux propriétés anti-arthritiques confirmées (Djorie, 2014). En parallèle, nous évaluons la modulation de bactéries intestinales sensibles à l'administration du lait de femme.

4.3.2 Matériel et méthodes

4.3.2.1 Animaux et conception de l'étude.

Toutes les expériences sont menées en suivant les directives de 2010 de l'UE et ont été approuvés par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Lille, France). Seize souris femelles NOD / LTJ (Charles Rivers, France), âgées de 4 semaines, sont réparties en 3 groupes à raison de 4 souris par cage. Toutes les souris avaient libre accès à des granulés stériles (AUR, Epinay-sur-Orge, France). Les agrégats bifides BI CBi0703_{BC} issus de la fermentation non régulée de la souche de *B.longum* CBi0703 sont administrés quotidiennement ad libitum à 4 souris à partir de l'âge de 5 semaines à la dose anti-inflammatoire de 0,2mg/L. Un groupe de 4 souris a reçu le pool de lait de femme délipidé utilisé dans la thèse de Sané (Sané, 2012). Le groupe Contrôle composé de 8 souris avait

accès à de l'eau stérile. Les volumes restants non bus sont relevés chaque matin afin de déterminer la quantité ingérée.

4.3.2.2 Suivi de la glycémie

Les relevés du poids corporel, de la glycémie (collecte à la veine caudale- max 0.1ml) par le système Contour TS TM (Bayer HealthCare), de la glycosurie (urine émise par les souris déposées individuellement dans une cage propre dédiée à la collecte-désinfection entre chaque animal) en utilisant des bandelettes de test (Multistix TM, Siemens Healthcare Diagnostics) sont effectués de façon bi-hebdomadaire. Les souris sont considérées diabétiques si deux glycémies consécutives sont supérieures à 14mM/l de sang ou 55 mM de glucose / L d'urine et sont sacrifiées la semaine suivante.

4.3.2.3 Prélèvements.

Des échantillons fécaux sont recueillis une fois par semaine et une fraction est transférée en chambre anaérobie. Les échantillons sont homogénéisés dans une solution de Ringer cystéinée et dilués en série pour le dénombrement des bactéries. Une seconde fraction des échantillons fécaux est conservée à -20°C pour la quantification par PCR.

À la fin de la période d'étude (six mois), les souris vivantes restantes sont euthanasiées par inhalation d'halothane.

4.3.2.4 Quantification des bactéries intestinales.

Les bifidobactéries, les bactéries lactiques et les entérobactéries viables sont énumérées par étalement des dilutions des matières fécales sur gélose Beerens (Becton Dickinson) pour les bifidobactéries, MRS (Becton Dickinson) et Slanetz (Becton Dickinson) pour les bactéries lactiques et EMB (Becton Dickinson) pour les entérobactéries. L'identification des

bifidobactéries et des lactobacilles est réalisée par séquençage du gène de l'ADNr 16S (Genoscreen, France). L'identification des entérocoques, des aérocoques et des entérobactéries est effectuée par système Vitek (Biomérieux, France).

Le dénombrement des spores est effectué par étalement de la suspension des matières fécales chauffées à 75 °C pendant 10 min sur gélose au sang de cheval (Columbia de base agar, Becton Dickinson) supplémentée avec du glucose (0,5%) et de la cystéine-HCl (0,03%). Les colonies isolées sont prélevées et leur ADN est extrait. *Anaerotruncus* est identifié par séquençage de l'ADNr 16S (Genoscreen, France). Enfin, le taux de bactéries anaérobies fécales est estimé par dénombrement sur gélose au sang de cheval (base de gélose Columbia, Becton Dickinson) supplémenté avec du glucose (0,5%), la cystéine-HCl (0,03%) et de la gentamicine (100µg/ml). Hormis pour les EMB, les boîtes sont incubées dans une chambre anaérobie et les colonies sont dénombrées après 5 jours d'incubation à 37°C.

4.4.2.5 Analyse statistique.

Les variations du nombre de bactéries sont analysées en fonction du déclenchement du diabète et des pratiques d'alimentation (CBi0703_{BC}) à l'aide du modèle mixte linéaire ANOVA pour mesures répétées dans lequel les temps d'échantillonnage sont la variable répétée (Xlstat) avec le test post-hoc Coroner-Iman et la correction de Bonferonni. Les fréquences d'isolement de bactéries par souris sont comparées en utilisant des tests de Mann-Whitney (XLSTAT).

4.3.3 Résultats

4.3.3.1 Prévention du DT1

Les souris NOD/LTJ femelles âgées de 4 semaines à la réception sont réparties en 3 groupes. Les animaux du groupe contrôle (n= 8) ont un accès illimité à l'eau stérile. Les animaux du

groupe BI CBI0703_{BC} (n=4) et LF (n=4) ont accès respectivement aux composés BI CBI0703_{BC} et au lait de femme délipidé. L'incidence de DT1 montre une tendance plus forte dans le groupe contrôle par rapport aux groupes LF et BI CBI0703_{BC} (Fig. 34). En effet, 1 souris sur 4 (25%) déclenche la maladie dans le groupe LF, 2/4 (50%) dans le groupe BI CBI0703_{BC} contre 6/8 (75%) dans le groupe contrôle (Fig. 34). Cette observation n'est pas statistiquement significative au vue du faible nombre de souris mais donne une indication d'efficacité. En effet, les essais préalables avec des souris NOD traitées par le lait de femme montraient qu'une différence significative, le taux de DT1 sous lait de femme étant de 25% (Sané, 2012).

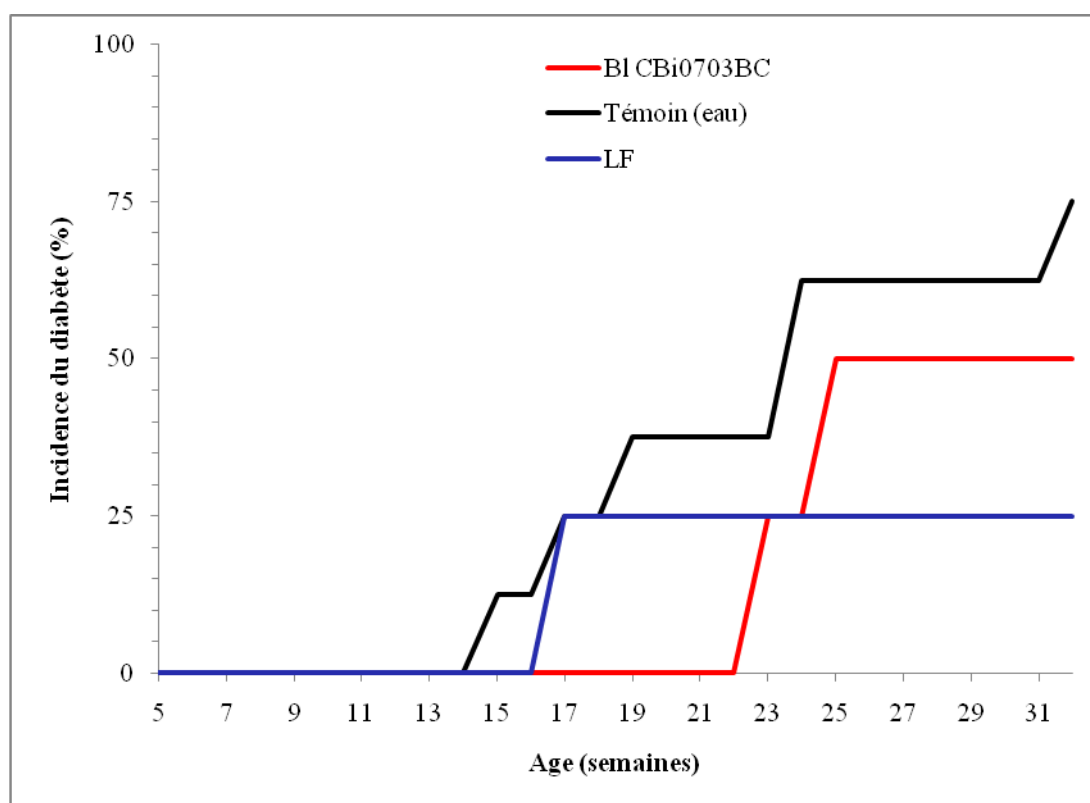


Fig. 34 : Incidence du diabète de type 1 chez les souris NOD. L'incidence du diabète de type 1 est présentée en bleu pour les souris NOD ayant accès au lait maternel (LF, n=4) , en rouge pour les souris ayant accès aux composés BICBI0703BC (n=4) , en noir pour les souris ayant accès à l'eau stérile (Témoin, n=8).

Dans cet essai, si l'effet protecteur du lait maternel écrémé est notable, comme précédemment décrit, dans la prévention des diabètes à déclaration tardive, c'est au contraire une protection précoce mais qui ne persiste pas qui est observée sous agrégats bifides. En effet, aucune souris du groupe BI CBI0703 ne déclenche de diabète avant la semaine 22 alors que chez 3/8 souris du le groupe Témoin et la seule souris du groupe LF présentant un diabète, sont diabétiques depuis au moins 3 semaines (Fig. 34).

4.3.3.2 Modulation de la flore

➤ Portage en bifidobactéries

Au cours de cet essai, la recherche des bifidobactéries dans les selles des souris est réalisée par culture et par amplification génique. A part une souris témoin chez laquelle de l'ADN bifide est détecté à 30 semaines, ces techniques n'ont pas permis de détecter les bifidobactéries. L'absence de bifidobactéries pourrait s'expliquer par l'évolution des normes d'hygiène et des conditions d'élevage des établissements fournisseurs. On remarque en outre, l'absence d'effets bifidigènes du lait maternel ou des agrégats BI CBI0703_{BC}.

➤ Variations des bactéries intestinales au cours de l'essai

Nous nous intéressons principalement aux bactéries intestinales sensibles à la prise de lait de femme (Sané, 2012). Ainsi les résultats des dénombrements d'entérocoques sur Slanetz ne montrant aucune différence en fonction de l'alimentation ou du développement du diabète ne sont pas présentés.

• Entérobactéries

La quantité d'entérobactéries fécales fluctue au cours du temps ($p < 0,0001$) et en fonction du régime alimentaire des souris ($p = 0,014$) (Fig. 35A). Les entérobactéries sont composées majoritairement d'*E.coli*. La quantité d'*E.coli* dans le groupe BI CBI0703_{BC} est significativement différente de celle des groupes Témoins ($p < 0,0001$) et LF ($p = 0,003$). C'est

entre les semaines 10 et 16, que la quantité d'entérobactéries est significativement plus élevée dans le groupe BI CBI0703_{BC} par rapport au groupe Témoin ($p=0,031$) alors qu'elle est significativement supérieure au groupe LF uniquement en semaine 11 ($p=0,028$).

On remarque par ailleurs qu'indépendamment du régime alimentaire, les souris du groupe Témoin n'ayant pas développées le diabète (D-) et les souris développant un diabète (D+) ne montrent pas les mêmes profils de colonisation ($p < 0,0001$) (Fig. 35B).

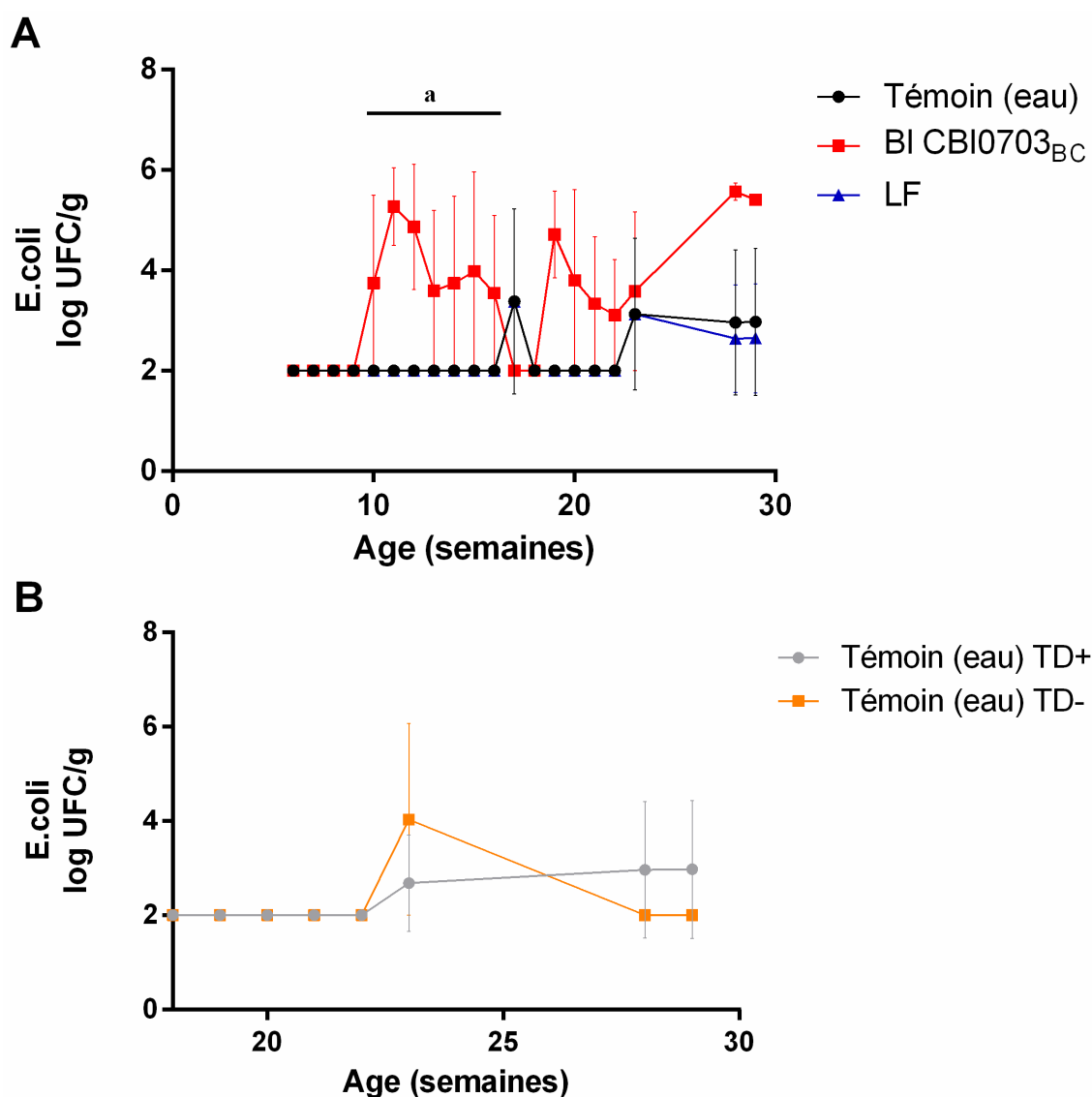


Fig. 35 : Variation des populations d'*E.coli* au cours de l'essai dans les différents groupes. (A) Variation au cours du temps en fonction du régime alimentaire, ^a représente la période (s10 à s16) dans laquelle la population d'*E.coli* est significativement plus élevée dans le groupe BI CBI0703_{BC} par rapport au groupe Témoin ($p=0,031$) ; (B) Variation des taux d'*E.coli* au cours du temps chez les souris Témoins en fonction du déclenchement du DT1. En UFC/g de selles.

- Lactobacilles

Les taux de Lactobacilles totales fluctuent également au cours du temps ($p < 0,0001$). Deux espèces sont identifiées dans les selles : *L. reuteri* et *L.johnsoni*.

Les populations de *L.reuteri* et *L. johnsonii* sont variables au cours du temps (respectivement, $p < 0,0001$ et $p < 0,015$). Par contre seule la population de *L. reuteri* est influencée par le régime alimentaire indépendamment ($p = 0,013$) ou en tant que cofacteur du temps ($p = 0,012$). En outre, chez les souris ne déclenchant pas le diabète, la colonisation par *L.reuteri* est différente sous traitement par BI CBI0703_{BC} par rapport à celle des souris témoins ($p = 0,040$) (Fig. 36).

Le lait de femme stimule la prolifération de *L.reuteri* en semaine 6 par rapport aux groupes Témoin ($p = 0,015$) et BI CBI0703_{BC} ($p = 0,002$) et en semaine 8, par rapport au seul témoin ($p = 0,003$) (Fig. 36). Les souris traitées par les agrégats bifides montrent une augmentation de *L.reuteri* à la semaine 8 qui rejoint la colonisation des souris sous lait de femme et est supérieure à celle des témoins ($p = 0,013$). La population de *L.reuteri* des souris témoins augmente pendant cette période pour atteindre une colonisation comparable aux deux autres groupes après la semaine 10.

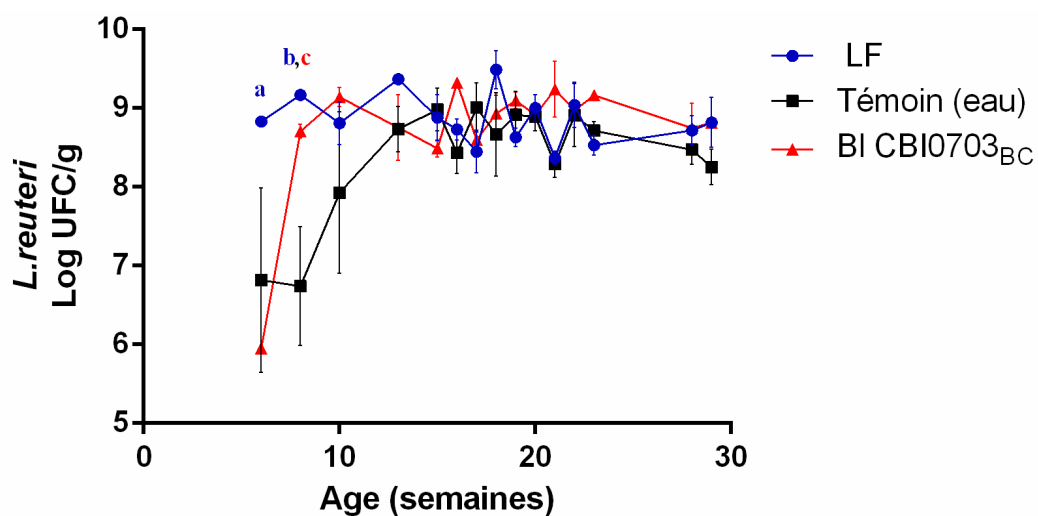
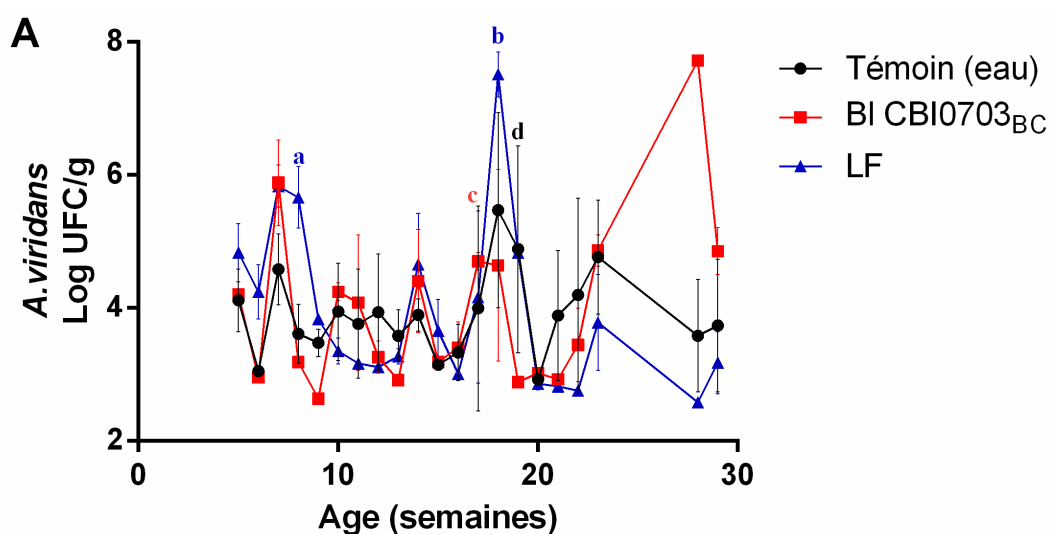


Fig. 36 : Variation des populations de *L.reuteri* au cours de l'essai au cours de l'étude. ^a représente la période dans laquelle la population de *L.reuteri* est significativement plus élevée dans le groupe LF par rapport

aux groupes Témoin ($p=0,015$) et BI CBI0703_{BC} ($p=0,002$) en semaine 6. Le taux de *L.reuteri* est significativement moins élevé dans le groupe Témoin par rapport aux groupes LF ($p=0,003$) et BICBI0703_{BC} ($p=0,013$). En UFC/g de selles.

- *Aerococcus viridans*

Le taux d'*Aerococcus viridans* varie de manière significative au cours du temps ($p<0,0001$) (Fig. 37A). Le régime alimentaire influence la population en tant que co-facteur du temps ($p<0,0001$). Fait remarquable, on observe au cours de l'essai une différence significative entre les souris du groupe témoin, déclenchant ou non le diabète, le premier montrant une excrétion plus importante d'*A.viridans* chez les souris âgées de plus de 22 semaines ($p=0,009$) (Fig.37B). Il existe également une différence significative entre les populations d'*A.viridans* colonisant les souris ne déclenchant pas le diabète selon qu'elles reçoivent des agrégats ou de l'eau ($p=0,012$). En revanche, le facteur alimentaire influe sur la population de manière très variable au cours du temps. Ainsi, la population de *A.viridans* chez les souris recevant du lait de femme est supérieure à celle établie chez les souris recevant des agrégats bifides lorsque les souris sont âgées de 8 et 18 semaines ($p=0,028$; $p=0,027$). Chez les souris âgées de 17 semaines, c'est sous agrégats que le taux d'*A.viridans* est significativement supérieure à celui du groupe Témoin ($p=0,002$) alors qu'on observe l'inverse en semaine 19 ($p=0,023$).



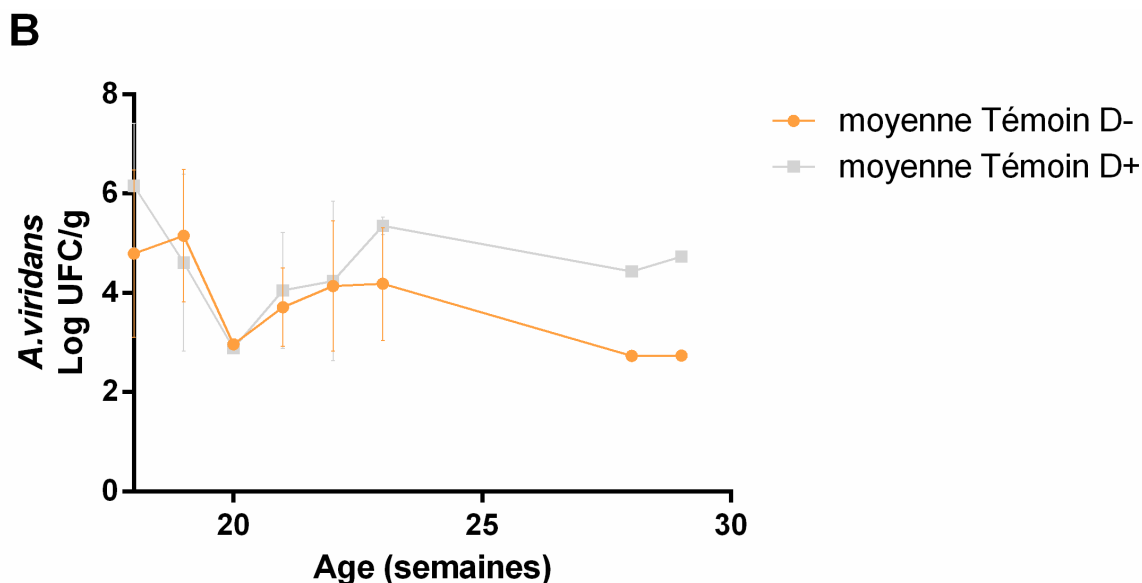


Fig. 37 : Variation des *A.viridans* au cours du temps en fonction du régime alimentaire. (A) Variation du taux d'*A.viridans* au cours du temps en fonction du régime alimentaire, ^a représente les semaines au cours desquelles la population de *A.viridans* est significativement plus élevée dans le groupe LF que dans le groupe Bl CBi0703_{BC} (s8 : p=0,028 ; s18 : p= 0,027). A la semaine 17, le taux est plus élevé dans le groupe CBi0703_{BC} que dans le groupe Témoin (^c, p=0,002) alors que l'on observe l'inverse en semaine 19 (^d, p=0,023) ; (B) Variation des taux d'*A.viridans* au cours du temps chez les souris Témoins en fonction du déclenchement du DT1 (p=0,009). En UFC/g de selles.

- *Anaerotruncus colihominis*

Les taux d'*Anaerotruncus colihominis* (sous forme sporulée et/ou végétative) varient au cours du temps. Le régime alimentaire n'influence pas de manière significative la population hormis en semaine 9 où les taux sont significativement plus élevés pour le groupe LF par rapport au groupe Bl CBi0703_{BC} (p=0,039) et en semaine 11 où la quantité est supérieure dans le groupe Bl CBi0703_{BC} que dans le groupe Témoin (p=0,040).

4.3.4 Discussion

Les premiers jours après la naissance le lait maternel montre des taux très variables de bifidobactéries, plus particulièrement de *B.longum*, espèce sécrétrice de lipoprotéines. Nous avons vu que, même si les bifidobactéries sont mortes, elles peuvent être captées au niveau des plaques de Peyer. Cependant, chez le nourrisson, il faut attendre environ 15 jours pour observer un phénomène de capture de bactéries au niveau de l'appendice (Gebbers & Laissue, 2004). Cette phase de latence correspond à la constitution de ganglions lymphoïdes. Il est donc très peu probable que les inoculi de bifidobactéries du lait soient capturés par les cellules de l'immunité réparties de façon diffuse dans l'intestin pendant la période néonatale.

La supplémentation aléatoire d'inoculi bifides par le lait maternel pose par contre la question de leur effet sur la maturation du système immunitaire du nourrisson. Avant que la colonisation de l'intestin par les bifidobactéries soit établie, ces stimuli aléatoires peuvent jouer un rôle (4-5 jours voire plus si le bébé est né par césarienne). On remarque que la quantité de bifidobactéries complémentaires apportée lors d'une tétée reste faible (au maximum de l'ordre de 10 millions de bifidobactéries totales, soit un maximum d'environ 500 000 UFC de *B.longum*). Dans le travail de Cabrera-Rubio et al, les laits de mamans finlandaises ont un portage de bifidobactéries moins fréquent après 6 mois de lactation (Cabrera-Rubio et al., 2012). Il serait intéressant de rechercher si, pendant les deux premiers mois de lactation, le même infléchissement est retrouvé chez les mamans françaises.

Dans les essais de prévention chez les souris NOD, le lait maternel apportait de façon constante un inoculum proche du million de bifidobactéries mortes totales (entre $7,4$ et $9 \cdot 10^5$ UFC/jour) dont environ $5,2$ à $6,5 \cdot 10^4$ *B.longum* mortes/jour/souris. Par contre, par la prise journalière des agrégats bifides à la dose de $0,2\text{mg/l}$, on apporte 100 fois moins de *B.longum* morts (entre 350 et 500 UFC *B.longum*/souris/jour). Or, nous avons montré dans le chapitre 3

que les bifidobactéries mortes peuvent être captées (détection dans les plaques de Peyer). Ce phénomène de capture, décrit dans la littérature, est assuré par les cellules dendritiques Cd11c+ (Hiramatsu et al., 2011). On peut penser que le nombre de *B.longum* mortes captées par les souris recevant du lait de femme sera plus important que chez les souris traitées par les agrégats. Bien que la recirculation des cellules Cd11c+ ne semble pas effective, le système immunitaire est probablement stimulé par cette phagocytose. Il serait donc possible que la capture différentielle des bifidobactéries mortes comme substance potentiellement active soit à l'origine des différences observées entre l'administration du lait de femme et les agrégats bifides dans la prévention du DT1.

Par ailleurs, l'administration de lait de femme chez les souris NOD module la flore intestinale. Or, nous avons montré dans le chapitre 3, que les agrégats bifides peuvent affecter la vitesse ou le taux de passage iléal de certaines bactéries. Nous nous sommes donc intéressés au pouvoir modulateur des agrégats bifides sur la flore.

Chez les souris NOD sous agrégats bifides, la prévention des diabètes à déclenchement précoce pourrait être liée à l'augmentation significative des populations d'*E.coli* observée entre les semaines 10 et 16. L'administration des agrégats bifides a pour effet d'augmenter significativement les populations d'*E.coli* à un stade précoce (chez des souris âgées de 10 à 16). Or, aucune souris sous agrégats bifides ne déclenche le diabète avant la semaine 23 contrairement aux groupes LF et Témoin dans lesquels les premiers déclenchements apparaissent entre les semaines 14 et 16. Ainsi, ce retard dans le déclenchement pourrait être lié à l'augmentation des populations d'*E.coli*, dont on connaît l'importance dans l'induction de la tolérance aux antigènes. Cependant, cet effet semble être néfaste sur le long terme, puisque à partir de 22 semaines on observe un taux très bas en *E.coli* chez les souris Témoins non diabétiques et LF alors qu'il augmente fortement chez les souris sous agrégats. Or, aucun déclenchement n'est observé chez les souris sous LF à partir de la semaine 22. En outre,

l'acide glutamique décarboxylase (GAD) est reconnu dans la littérature comme un auto-antigène primaire impliqué dans le déclenchement du DT1 (Menard et al., 1999). Cette enzyme décrite chez *E.coli* présente une forte ressemblance avec celle des mammifères (Ueno, 2000). Par conséquent, si dans un premier temps l'augmentation de la population d'*E.coli* peut induire une tolérance favorable à l'homéostasie microbiote-hôte, elle pourrait, chez des animaux plus âgés, activer le processus auto-immun.

D'autre part, le déclenchement des diabètes tardifs chez les souris sous agrégats pourrait également être lié à leur incapacité à reproduire les effets du lait de femme. En effet, chez les souris LF, protégées des diabètes à déclenchement tardif, on observe une population d'*A. viridans* plus faible ($< 4 \log \text{ UFC/g}$) à partir de la semaine 23 que chez les souris traitées par les agrégats bifides et que chez les souris témoins déclenchant un diabète. On sait que des lectines de type ficolines peuvent induire la répression d'*A. viridans* (Tsujimura et al., 2002). Les ficolines reconnaissent la N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine et participent à la lutte anti-infectieuse via l'activation de la voie du complément. Chez l'homme, la ficoline H est retrouvée dans le canal cholédoque, d'où elle peut être excrétée dans la lumière intestinale (Matsushita, 2010). On peut penser que les agrégats bifides sont également reconnus par les ficolines. La prolifération des aérocoques chez les souris âgées sous agrégats peut être le résultat d'une reconnaissance compétitive de ficolines et des agrégats au détriment des cocci. L'administration de dose plus faible d'agrégats semble souhaitable.

Par ailleurs, bien qu'ils ne soient pas directement liés au diabète, on observe une augmentation rapide de *L.reuteri* à un stade précoce chez les souris NOD sous LF et agrégats bifides. Les populations de lactobacilles pourraient jouer préventif important dans le déclenchement du processus auto-immun. Une étude a montré que chez rats BB-DR, la

proportion des lactobacilles est plus élevée que chez les rats BB-DP à un stade précoce avant déclenchement du diabète (Roesch et al., 2009). De plus, chez les souris NOD la stimulation des cellules dendritiques avec des lactobacilles permet de développer un phénotype tolérogène par la production de cytokine anti-inflammatoire (Manirarora et al., 2011).

En conclusion, les agrégats bifides à la dose continue de 0,2mg/L semblent être préventifs dans les diabètes à déclenchement précoce mais cet effet ne perdure pas. L'incapacité de reproduire les effets du lait maternel pourrait venir de l'effet dose. En effet, les quantifications dans les différents lots de lait de femme montrent une variabilité importante au cours de la lactation (avec des cycles présence/absence de *B.longum*). Ainsi, une solution serait une administration séquentielle et dégressive des agrégats bifides pourrait pallier leur manque d'efficacité dans la prévention des diabètes à déclenchement tardifs.

Pour se rapprocher au plus près des effets du lait maternel, il sera donc indispensable de déterminer la quantité réelle d'agrégats sécrétés dans le lait maternel. Il sera également nécessaire de vérifier le taux d'agrégation des lipoprotéines bifides, sachant que le pH du lait maternel varie entre 6 et 7. Une fois ces éléments assurés, les agrégats bifides pourraient entrer dans la composition de compléments alimentaires pour le nourrisson.

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

Nous avons montré que les composés bifides de Bb C50_{SN}, support de l'activation des cellules dendritiques via le TLR2, sont des agrégats de poids moléculaire supérieur à 200kDa associant des lipoprotéines et des sucres, principalement de glucose, vraisemblablement recouverts par des oligosaccharides contenant des hexosamines. L'espèce *B.longum* sécrète de tels composés pendant la fermentation de milieu dérivé du lait. Les agrégats de *B.longum* et *B.breve* partagent la même structure globale (lipoprotéine avec un domaine CHAP associée à des sucres). Cependant, la séquence protéique et la teneur en sucres et lipides diffèrent avec comme conséquence principale l'incapacité des agrégats de *B.longum* de lier le TLR6. Contrairement aux agrégats de *B.breve* C50, il est peu probable que les agrégats de *B.longum* puissent induire une réponse immunitaire via la voie du TLR6.

Bien que les agrégats de *B.longum* puissent modifier le transcriptome des cellules dendritiques, il semble peu probable que leur mécanisme d'action soit associé à une phagocytose. Il apparaît que ces agrégats agissent via leur glucanes exposés en surface directement dans l'intestin en régulant la translocation et la flore intestinale.

La recherche par PCR du gène codant pour la lipoprotéine d'intérêt a permis la détection de *B.longum* dans plus de la moitié des échantillons de lait maternel avec des variations quantitatives au cours de la lactation. A l'inverse, *B.breve* est rarement isolé. Comme l'analyse transcriptomique indique que les lipoprotéines sont synthétisées de façon continue, elles peuvent donc être sécrétées par les bifidobactéries dans le lait de femme. Les agrégats de *B.longum*, testés à une dose anti-inflammatoire en prévention anti-diabétique montrent une protection précoce mais qui ne persiste pas. De plus, ils ne modulent pas à la même vitesse les

bactéries intestinales sensibles au lait de femme, ce qui pourrait expliquer le retard d'apparition des premiers diabètes lors du traitement.

Même si les résultats préliminaires en prévention anti-diabétiques sont encourageants, il est nécessaire de les conforter.

Plusieurs champs d'investigation sont ouverts à l'issu de ce travail :

- Isolement et quantification des agrégats bifides dans le lait maternel
- Détermination de leurs conformation/agrégation dans le lait maternel
- Répétition des essais de prévention chez les souris NOD avec des agrégats bifides produits par fermentation vs isolés du lait de femme.

Références bibliographiques

- Abdel-Megeid, F.Y., Bakeit, Z.A., Karim, B.O. 2011. Early introduction of cow's milk and short duration of breastfeeding is associated with increasing risk of juvenile diabetes. *World Journal of Medical Sciences* **6**(2)(4-60).
- Abreu, M.T., Fukata, M., Arditi, M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*, **174**(8), 4453-60.
- Aigal, S., Claudinon, J., Romer, W. 2015. Plasma membrane reorganization: A glycolipid gateway for microbes. *Biochim Biophys Acta*, **1853**(4), 858-71.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**(4), 783-801.
- Alam, C., Bittoun, E., Bhagwat, D., Valkonen, S., Saari, A., Jaakkola, U., Eerola, E., Huovinen, P., Hanninen, A. 2011. Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia*, **54**(6), 1398-406.
- Alegria, A., Delgado, S., Guadamuro, L., Florez, A.B., Felis, G.E., Torriani, S., Mayo, B. 2014. The genome of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* IPLA 36007, a human intestinal strain with isoflavone-activation activity. *Gut Pathog*, **6**, 31.
- Alidjinou, E.K., Sane, F., Engelmann, I., Geenen, V., Hober, D. 2014. Enterovirus persistence as a mechanism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med*, **18**(100), 273-82.
- Alvarez-Martin, P., Florez, A.B., Mayo, B. 2007. Screening for plasmids among human bifidobacteria species: sequencing and analysis of pBC1 from *Bifidobacterium catenulatum* L48. *Plasmid*, **57**(2), 165-74.
- Arunachalam, K., Gill, H.S., Chandra, R.K. 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr*, **54**(3), 263-7.
- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T., Yamamoto, K. 2009. Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*, **19**(9), 1010-7.
- Ataie-Jafari, A., Larijani, B., Alavi Majd, H., Tahbaz, F. 2009. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann Nutr Metab*, **54**(1), 22-7.
- Atkinson, M.A., Chervonsky, A. 2012. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia*, **55**(11), 2868-77.
- Bach, J.F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, **347**(12), 911-20.
- Badami, E., Sorini, C., Coccia, M., Usuelli, V., Molteni, L., Bolla, A.M., Scavini, M., Mariani, A., King, C., Bosi, E., Falcone, M. 2011. Defective differentiation of regulatory FoxP3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, **60**(8), 2120-4.
- Baffoni, L., Stenico, V., Strahsburger, E., Gaggia, F., Di Gioia, D., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B. 2013. Identification of species belonging to the *Bifidobacterium* genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment. *BMC Microbiol*, **13**, 149.

- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H. 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, **269**(33), 20807-10.
- Barrangou, R., Briczinski, E.P., Traeger, L.L., Loquasto, J.R., Richards, M., Horvath, P., Coute-Monvoisin, A.C., Leyer, G., Rendulic, S., Steele, J.L., Broadbent, J.R., Oberg, T., Dudley, E.G., Schuster, S., Romero, D.A., Roberts, R.F. 2009. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *J Bacteriol*, **191**(13), 4144-51.
- Bateman, A., Rawlings, N.D. 2003. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci*, **28**(5), 234-7.
- Baum, L.G., Garner, O.B., Schaefer, K., Lee, B. 2014. Microbe-Host Interactions are Positively and Negatively Regulated by Galectin-Glycan Interactions. *Front Immunol*, **5**, 284.
- Bergerot, I., Arreaza, G., Cameron, M., Chou, H., Delovitch, T.L. 1997. Role of T-cell anergy and suppression in susceptibility to IDDM. *Res Immunol*, **148**(5), 348-58.
- Bezirtzoglou, E., Maipa, V., Chotoura, N., Apazidou, E., Tsiotsias, A., Voidarou, C., Kostakis, D., Alexopoulos, A. 2006. Occurrence of *Bifidobacterium* in the intestine of newborns by fluorescence in situ hybridization. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **29**(5-6), 345-52.
- Bezirtzoglou, E., Romond, C. 1990. Occurrence of *Bifidobacterium* in the feces of newborns delivered by cesarean section. *Biol Neonate*, **58**(5), 247-51.
- Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., Brigidi, P., De Vos, W. 2010. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, **5**(5), e10667.
- Biavati, B., Crociani, F., Mattarelli, P., Scardovi, V. 1992. Phase variations in *Bifidobacterium animalis*. *Curr Microbiol*, **25**(1), 51-5.
- Blanc, L., Castanier, R., Mishra, A.K., Ray, A., Besra, G.S., Sutcliffe, I., Vercellone, A., Nigou, J. 2013. Gram-positive bacterial lipoglycans based on a glycosylated diacylglycerol lipid anchor are microbe-associated molecular patterns recognized by TLR2. *PLoS One*, **8**(11), e81593.
- Bodansky, H.J., Staines, A., Stephenson, C., Haigh, D., Cartwright, R. 1992. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a trans migratory population. *BMJ*, **304**(6833), 1020-2.
- Bonnaillie, L.M., Tomasula, P.M. 2012. Kinetics, aggregation behavior and optimization of the fractionation of whey protein isolate with hydrochloric acid. *Food and Bioproducts Processing*, **90**(C4), 737-747.
- Borch-Johnsen, K., Joner, G., Mandrup-Poulsen, T., Christy, M., Zachau-Christiansen, B., Kastrup, K., Nerup, J. 1984. Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. *Lancet*, **2**(8411), 1083-6.
- Bosi, E., Molteni, L., Radaelli, M.G., Folini, L., Fermo, I., Bazzigaluppi, E., Piemonti, L., Pastore, M.R., Paroni, R. 2006. Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia*, **49**(12), 2824-7.
- Bottacini, F., O'Connell Motherway, M., Kuczynski, J., O'Connell, K.J., Serafini, F., Duranti, S., Milani, C., Turrone, F., Lugli, G.A., Zomer, A., Zhurina, D., Riedel, C., Ventura, M., van Sinderen, D. 2014. Comparative genomics of the *Bifidobacterium breve* taxon. *BMC Genomics*, **15**, 170.
- Braun, V., Wu, H.C. 1993. *Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export*. J-M Ghuysen and R. Hakenback ed.

- Brenner, D.M., Moeller, M.J., Chey, W.D., Schoenfeld, P.S. 2009. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am J Gastroenterol*, **104**(4), 1033-49; quiz 1050.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. 1972. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*, **96**(3), 544-51.
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., Corneli, R.B., Ferretti, E., Gulino, A., Grasso, F., De Simone, C., Di Mario, U., Falorni, A., Boirivant, M., Dotta, F. 2005. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, **48**(8), 1565-75.
- Candela, M., Bergmann, S., Vici, M., Vitali, B., Turrone, S., Eikmanns, B.J., Hammerschmidt, S., Brigidi, P. 2007. Binding of human plasminogen to Bifidobacterium. *J Bacteriol*, **189**(16), 5929-36.
- Cannon, J.P., Lee, T.A., Bolanos, J.T., Danziger, L.H. 2005. Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **24**(1), 31-40.
- Cardwell, C.R., Stene, L.C., Joner, G., Cinek, O., Svensson, J., Goldacre, M.J., Parslow, R.C., Pozzilli, P., Brigis, G., Stoyanov, D., Urbonaite, B., Sipetic, S., Schober, E., Ionescu-Tirgoviste, C., Devoti, G., de Beaufort, C.E., Buschard, K., Patterson, C.C. 2008. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia*, **51**(5), 726-35.
- Carratu, R., Secondulfo, M., de Magistris, L., Iafusco, D., Urio, A., Carbone, M.G., Pontoni, G., Carteni, M., Prisco, F. 1999. Altered intestinal permeability to mannitol in diabetes mellitus type I. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **28**(3), 264-9.
- Caselli, M., Vaira, G., Calo, G., Papini, F., Holton, J., Vaira, D. 2011. Structural bacterial molecules as potential candidates for an evolution of the classical concept of probiotics. *Adv Nutr*, **2**(5), 372-6.
- Chehadeh, W., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Alm, G., Lefebvre, J., Wattre, P., Hober, D. 2000a. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol*, **74**(21), 10153-64.
- Chehadeh, W., Weill, J., Vantghem, M.C., Alm, G., Lefebvre, J., Wattre, P., Hober, D. 2000b. Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *J Infect Dis*, **181**(6), 1929-39.
- Chiu, Y.H., Tsai, J.J., Linc, S.L., Chotirosvakina, C., Lina, M.Y. 2014. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk. *Journal of Functional Foods* **7**, 700-708.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Dasen, G., Leo, M., Le Blay, G. 2010. Comparative study of a new quantitative real-time PCR targeting the xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase bifidobacterial gene (xpf) in faecal samples with two fluorescence in situ hybridization methods. *J Appl Microbiol*, **108**(1), 181-93.
- Collado, M.C., Delgado, S., Maldonado, A., Rodriguez, J.M. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*, **48**(5), 523-8.

- Collado, M.C., Derrien, M., Isolauri, E., de Vos, W.M., Salminen, S. 2007. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol*, **73**(23), 7767-70.
- Coppa, G.V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S., Gabrielli, O. 2004. The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *J Clin Gastroenterol*, **38**(6 Suppl), S80-3.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*, **149**(1), 4-18.
- Dahl-Jorgensen, K., Joner, G., Hanssen, K.F. 1991. Relationship between cows' milk consumption and incidence of IDDM in childhood. *Diabetes Care*, **14**(11), 1081-3.
- Dang, D., Zhou, W., Lun, Z.J., Mu, X., Wang, D.X., Wu, H. 2013. Meta-analysis of probiotics and/or prebiotics for the prevention of eczema. *J Int Med Res*, **41**(5), 1426-36.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol*, **31**(6), 438-42.
- Di Virgilio, S., Glushka, J., Moremen, K., Pierce, M. 1999. Enzymatic synthesis of natural and ¹³C enriched linear poly-N-acetyllactosamines as ligands for galectin-1. *Glycobiology*, **9**(4), 353-64.
- Diaz, R.L., Hoang, L., Wang, J., Vela, J.L., Jenkins, S., Aranda, R., Martin, M.G. 2004. Maternal adaptive immunity influences the intestinal microflora of suckling mice. *J Nutr*, **134**(9), 2359-64.
- Djorie, S. 2014. Thèse: Sélection et validation de nouvelles molécules bifides en pathologies inflammatoires et infectieuses Université d'Auvergne.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(26), 11971-5.
- Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X., Ling, D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50 Pt 1**, 119-25.
- Dotta, F., Censini, S., van Halteren, A.G., Marselli, L., Masini, M., Dionisi, S., Mosca, F., Boggi, U., Muda, A.O., Del Prato, S., Elliott, J.F., Covacci, A., Rappuoli, R., Roep, B.O., Marchetti, P. 2007. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(12), 5115-20.
- Drasar, R., Hill, M.J. 1974. *Human Intestinal flora*. Academic Press, London, New-york San Francisco ed.
- Dunne, J.L., Triplett, E.W., Gevers, D., Xavier, R., Insel, R., Danska, J., Atkinson, M.A. 2014. The intestinal microbiome in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*, **177**(1), 30-7.
- Dziarski, R., Wang, Q., Miyake, K., Kirschning, C.J., Gupta, D. 2001. MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components. *J Immunol*, **166**(3), 1938-44.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**(5728), 1635-8.
- Ewaschuk, J.B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van Langen, M., Madsen, K.L. 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **295**(5), G1025-34.

- Fagan, P.K., Reinscheid, D., Gottschalk, B., Chhatwal, G.S. 2001. Identification and characterization of a novel secreted immunoglobulin binding protein from group A streptococcus. *Infect Immun*, **69**(8), 4851-7.
- Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., van Sinderen, D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(6), 2108-13.
- FAO/WHO. 2010. Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Administration of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Felis, G.E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol*, **8**(2), 44-61.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., Rodriguez, J.M. 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*, **69**(1), 1-10.
- Foroni, E., Serafini, F., Amidani, D., Turrone, F., He, F., Bottacini, F., O'Connell Motherway, M., Viappiani, A., Zhang, Z., Rivetti, C., van Sinderen, D., Ventura, M. 2011. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus Bifidobacterium. *Microb Cell Fact*, **10 Suppl 1**, S16.
- Frisk, G., Diderholm, H. 2000. Tissue culture of isolated human pancreatic islets infected with different strains of coxsackievirus B4: assessment of virus replication and effects on islet morphology and insulin release. *Int J Exp Diabetes Res*, **1**(3), 165-75.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., Forstner, J.F. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic Escherichia coli to ganglioside GM1. *Appl Environ Microbiol*, **63**(2), 506-12.
- Furrie, E. 2006. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, **55**(2), 141-3.
- Gabius, H.J. 1997. Animal lectins. *Eur J Biochem*, **243**(3), 543-76.
- Gamble, D.R., Kinsley, M.L., FitzGerald, M.G., Bolton, R., Taylor, K.W. 1969. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J*, **3**(5671), 627-30.
- Gardy, J.L., Laird, M.R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C.J., Ester, M., Brinkman, F.S. 2005. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics*, **21**(5), 617-23.
- Garofalo, R. 2010. Cytokines in human milk. *J Pediatr*, **156**(2 Suppl), S36-40.
- Gavini, F., Pourcher, A.M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., Izard, D. 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int J Syst Bacteriol*, **41**(4), 548-57.
- Gebbers, J.O., Laissue, J.A. 2004. Bacterial translocation in the normal human appendix parallels the development of the local immune system. *Ann N Y Acad Sci*, **1029**, 337-43.
- Ghazarian, H., Itoni, B., Oppenheimer, S.B. 2011. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem*, **113**(3), 236-47.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*, **17**(2), 259-75.
- Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Novelo, L.L., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyoty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A., Triplett, E.W. 2011. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J*, **5**(1), 82-91.

- Gleinser, M., Grimm, V., Zhurina, D., Yuan, J., Riedel, C.U. 2012. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microb Cell Fact*, **11**, 80.
- Greenwood, J.R. 1983. Current taxonomic status of *Gardnerella vaginalis*. *Scand J Infect Dis Suppl*, **40**, 11-4.
- Groeger, D., O'Mahony, L., Murphy, E.F., Bourke, J.F., Dinan, T.G., Kiely, B., Shanahan, F., Quigley, E.M. 2013. *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes*, **4**(4), 325-39.
- Guarner, F., Malagelada, J.R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, **361**(9356), 512-9.
- Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., de los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A. 2009. Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance. *Appl Environ Microbiol*, **75**(10), 3153-60.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, **92**(1), 64-6.
- Guglielmetti, S., Mora, D., Gschwender, M., Popp, K. 2011. Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life--a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*, **33**(10), 1123-32.
- Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Minuzzo, M., Arioli, S., Parini, C., Comelli, E., Mora, D. 2009. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines. *Curr Microbiol*, **59**(2), 167-72.
- Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Mora, D., Minuzzo, M., Scarafoni, A., Arioli, S., Hellman, J., Karp, M., Parini, C. 2008. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*, **74**(15), 4695-702.
- Guglielmetti, S., Zanoni, I., Balzaretto, S., Miriani, M., Taverniti, V., De Noni, I., Presti, I., Stuknyte, M., Scarafoni, A., Arioli, S., Iametti, S., Bonomi, F., Mora, D., Karp, M., Granucci, F. 2014. Murein lytic enzyme TgaA of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 modulates dendritic cell maturation through its cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) amidase domain. *Appl Environ Microbiol*, **80**(17), 5170-7.
- Gyorgy, P., Rose, C.S. 1955. Further observations on the metabolic requirements of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. *J Bacteriol*, **69**(5), 483-90.
- Haarman, M., Knol, J. 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol*, **71**(5), 2318-24.
- Hajishengallis, G., Ratti, P., Harokopakis, E. 2005. Peptide mapping of bacterial fimbrial epitopes interacting with pattern recognition receptors. *J Biol Chem*, **280**(47), 38902-13.
- Hansen, C.H., Nielsen, D.S., Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., Hansen, A.K. 2012. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One*, **7**(3), e34043.
- Harjutsalo, V., Sjoberg, L., Tuomilehto, J. 2008. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*, **371**(9626), 1777-82.
- He, T., Priebe, M.G., Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Antoine, J.M., Welling, G.W., Vonk, R.J. 2008. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol*, **104**(2), 595-604.
- Henneke, P., Takeuchi, O., van Strijp, J.A., Guttormsen, H.K., Smith, J.A., Schromm, A.B., Espevik, T.A., Akira, S., Nizet, V., Kasper, D.L., Golenbock, D.T. 2001. Novel

- engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J Immunol*, **167**(12), 7069-76.
- Heuvelin, E., Lebreton, C., Grangette, C., Pot, B., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. 2009. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by bifidobacterium breve soluble factors. *PLoS One*, **4**(4), e5184.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Nikolic, M., Lopez, P., Suarez, A., Miljkovic, M., Kojic, M., Margolles, A., Golic, N., Ruas-Madiedo, P. 2014a. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe*, **26**, 24-30.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Sanchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. 2014b. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol*, **80**(1), 9-18.
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E., Yagi, F., Kasai, K. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, **1572**(2-3), 232-54.
- Hiramatsu, Y., Hosono, A., Konno, T., Nakanishi, Y., Muto, M., Suyama, A., Hachimura, S., Sato, R., Takahashi, K., Kaminogawa, S. 2011. Orally administered *Bifidobacterium* triggers immune responses following capture by CD11c(+) cells in Peyer's patches and cecal patches. *Cytotechnology*, **63**(3), 307-17.
- Hjern, A., Soderstrom, U., Aman, J. 2012. East Africans in Sweden have a high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care*, **35**(3), 597-8.
- Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y. 2006. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol*, **117**(3), 696-702.
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquín, C., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y. 2008. Supernatant from *bifidobacterium* differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS One*, **3**(7), e2753.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., Beutler, B. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, **433**(7025), 523-7.
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C. 2005. Production of beta-galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *Int J Food Microbiol*, **104**(2), 197-206.
- Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Falsen, E., Wauters, G., Vandamme, P. 2007. *Alloscardovia omnicoles* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**(Pt 7), 1442-6.
- Hyttinen, V., Kaprio, J., Kinnunen, L., Koskenvuo, M., Tuomilehto, J. 2003. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*, **52**(4), 1052-5.
- Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delley, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S., Arigoni, F. 2006. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J Biol Chem*, **281**(25), 17246-52.
- Iwasaki, H., Araki, Y., Ito, E., Nagaoka, M., Yokokura, T. 1990. Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *J Bacteriol*, **172**(2), 845-52.

- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E., Sanz, Y. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr Microbiol*, **56**(6), 613-8.
- Jaidane, H., Hober, D. 2008. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab*, **34**(6 Pt 1), 537-48.
- Jian, W., Dong, X. 2002. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**(Pt 3), 809-12.
- Jin, J., Qin, Q., Guo, H., Liu, S., Ge, S., Zhang, H., Cui, J., Ren, F. 2015. Effect of pre-stressing on the acid-stress response in bifidobacterium revealed using proteomic and physiological approaches. *PLoS One*, **10**(2), e0117702.
- Jo, J., Garssen, J., Knippels, L., Sandalova, E. 2014. Role of cellular immunity in cow's milk allergy: pathogenesis, tolerance induction, and beyond. *Mediators Inflamm*, **2014**, 249784.
- Johnston, B.A., Eisen, H., Fry, D. 1991. An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab Anim Sci*, **41**(1), 15-21.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C.P., Chassard, C. 2012. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PLoS One*, **7**(8), e44595.
- Junick, J., Blaut, M. 2012. Quantification of human fecal bifidobacterium species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the groEL gene. *Appl Environ Microbiol*, **78**(8), 2613-22.
- Kabeerdoss, J., Ferdous, S., Balamurugan, R., Mechenro, J., Vidya, R., Santhanam, S., Jana, A.K., Ramakrishna, B.S. 2013. Development of the gut microbiota in southern Indian infants from birth to 6 months: a molecular analysis. *J Nutr Sci*, **2**, e18.
- Kainulainen, V., Reunanen, J., Hiippala, K., Guglielmetti, S., Vesterlund, S., Palva, A., Satokari, R. 2013. BopA does not have a major role in the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to intestinal epithelial cells, extracellular matrix proteins, and mucus. *Appl Environ Microbiol*, **79**(22), 6989-97.
- Kalliora, M.I., Vazeou, A., Delis, D., Bozas, E., Thymelli, I., Bartsocas, C.S. 2011. Seasonal variation of type 1 diabetes mellitus diagnosis in Greek children. *Hormones (Athens)*, **10**(1), 67-71.
- Kaplan, H., Hutkins, R.W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol*, **66**(6), 2682-4.
- Kasai, K., Hirabayashi, J. 1996. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. *J Biochem*, **119**(1), 1-8.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, **4**(3), 363-71.
- Kheadr, E., Dabour, N., von Ah, U., Lacroix, C., Meile, L., Fliss, I. 2007. Genetic and phenotypic diversity of *Bifidobacterium thermacidophilum* fecal isolates from newborns. *Can J Microbiol*, **53**(12), 1348-59.
- Kikutani, H., Makino, S. 1992. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol*, **51**, 285-322.
- Killer, J., Sedlacek, I., Rada, V., Havlik, J., Kopečný, J. 2013. Reclassification of *Bifidobacterium stercoris* Kim et al. 2010 as a later heterotypic synonym of *Bifidobacterium adolescentis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **63**(Pt 11), 4350-3.
- Kim, J.Y., Kwon, J.H., Ahn, S.H., Lee, S.I., Han, Y.S., Choi, Y.O., Lee, S.Y., Ahn, K.M., Ji, G.E. 2010. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*,

- Lactobacillus acidophilus) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol*, **21**(2 Pt 2), e386-93.
- King, C., Sarvetnick, N. 2011. The incidence of type-1 diabetes in NOD mice is modulated by restricted flora not germ-free conditions. *PLoS One*, **6**(2), e17049.
- Kiyohara, M., Tanigawa, K., Chaiwangsri, T., Katayama, T., Ashida, H., Yamamoto, K. 2011. An exo-alpha-sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology*, **21**(4), 437-47.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother*, **59**(5), 900-12.
- Knol, J., Scholtens, P., Kafka, C., Steenbakkers, J., Gro, S., Helm, K., Klarczyk, M., Schopfer, H., Bockler, H.M., Wells, J. 2005. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **40**(1), 36-42.
- Kojima, M., Suda, S., Hotta, S., Hamada, K. 1968. Induction of pleomorphism in Lactobacillus bifidus. *J Bacteriol*, **95**(2), 710-1.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyotylainen, T., Hamalainen, A.M., Peet, A., Tillmann, V., Poho, P., Mattila, I., Lahdesmaki, H., Franzosa, E.A., Vaarala, O., de Goffau, M., Harmsen, H., Ilonen, J., Virtanen, S.M., Clish, C.B., Oresic, M., Huttenhower, C., Knip, M., Xavier, R.J. 2015. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe*, **17**(2), 260-73.
- Kriegel, M.A., Sefik, E., Hill, J.A., Wu, H.J., Benoist, C., Mathis, D. 2011. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(28), 11548-53.
- Kuitunen, M., Saukkonen, T., Ilonen, J., Akerblom, H.K., Savilahti, E. 2002. Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1*02 allele. *Autoimmunity*, **35**(5), 365-8.
- Kullen, M.J., Bettler, J. 2005. The delivery of probiotics and prebiotics to infants. *Curr Pharm Des*, **11**(1), 55-74.
- Kurokawa, K., Ryu, K.H., Ichikawa, R., Masuda, A., Kim, M.S., Lee, H., Chae, J.H., Shimizu, T., Saitoh, T., Kuwano, K., Akira, S., Dohmae, N., Nakayama, H., Lee, B.L. 2012. Novel bacterial lipoprotein structures conserved in low-GC content gram-positive bacteria are recognized by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, **287**(16), 13170-81.
- Kwok, W.W., Domeier, M.L., Raymond, F.C., Byers, P., Nepom, G.T. 1996. Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J Immunol*, **156**(6), 2171-7.
- Lakhtin, V.M., Aleshkin, V.A., Lakhtin, M.V., Afanas'ev, S.S., Pospelova, V.V., Shenderov, B.A. 2006. [Lectins, adhesins, and lectin-like substances of lactobacilli and bifidobacteria]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*(1), 28-34.
- Lakhtin, V.M., Lakhtin, M.V., Cherepanova, Y.V., Afanasyev, S.S., Aleshkin, V.A. 2010. High molecular weight biosurfactants from human gram-positive bacteria. *Clin Lab Diagnostic*, **9**(37-8).
- Lamb, M.M., Miller, M., Seifert, J.A., Frederiksen, B., Kroehl, M., Rewers, M., Norris, J.M. 2015. The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of

- islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatr Diabetes*, **16**(1), 31-8.
- Lamendella, R., Santo Domingo, J.W., Kelty, C., Oerther, D.B. 2008. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Appl Environ Microbiol*, **74**(3), 575-84.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21), 2947-8.
- Lauer, E., Kandler, O. 1976. [Mechanism of the variation of the acetate/lactate/ratio during glucose fermentation by bifidobacteria (author's transl)]. *Arch Microbiol*, **110**(23), 271-7.
- Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol*, **98**(6), 1303-15.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*, **72**(4), 728-64, Table of Contents.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol*, **8**(3), 171-84.
- Lee, A.S., Gibson, D.L., Zhang, Y., Sham, H.P., Vallance, B.A., Dutz, J.P. 2010. Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia*, **53**(4), 741-8.
- Lee, J.H., Karamychev, V.N., Kozyavkin, S.A., Mills, D., Pavlov, A.R., Pavlova, N.V., Polouchine, N.N., Richardson, P.M., Shakhova, V.V., Slesarev, A.I., Weimer, B., O'Sullivan, D.J. 2008. Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics*, **9**, 247.
- Liang, S., Wang, M., Tapping, R.I., Stepensky, V., Nawar, H.F., Triantafilou, M., Triantafilou, K., Connell, T.D., Hajishengallis, G. 2007. Ganglioside GD1a is an essential coreceptor for Toll-like receptor 2 signaling in response to the B subunit of type IIb enterotoxin. *J Biol Chem*, **282**(10), 7532-42.
- LoCascio, R.G., Desai, P., Sela, D.A., Weimer, B., Mills, D.A. 2010. Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Appl Environ Microbiol*, **76**(22), 7373-81.
- Locascio, R.G., Ninonuevo, M.R., Kronewitter, S.R., Freeman, S.L., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A. 2009. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microb Biotechnol*, **2**(3), 333-42.
- Lopez, P., Gueimonde, M., Margolles, A., Suarez, A. 2010. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol*, **138**(1-2), 157-65.
- Louesdon, S., Charlot-Rouge, S., Tourdot-Marechal, R., Bouix, M., Beal, C. 2015. Membrane fatty acid composition and fluidity are involved in the resistance to freezing of *Lactobacillus buchneri* R1102 and *Bifidobacterium longum* R0175. *Microb Biotechnol*, **8**(2), 311-8.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**(1), 265-75.
- Lugli, G.A., Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Ferrario, C., Viappiani, A., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Taminiau, B., Dalcenserie, V., van Sinderen, D., Ventura, M. 2014.

- Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics. *Appl Environ Microbiol*, **80**(20), 6383-94.
- Luopajarvi, K., Savilahti, E., Virtanen, S.M., Ilonen, J., Knip, M., Akerblom, H.K., Vaarala, O. 2008. Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatr Diabetes*, **9**(5), 434-41.
- Ma, Y., Xie, T.T., Hu, Q., Qiu, Z., Song, F. 2015. Sequencing analysis and characterization of the plasmid pBIF10 isolated from *Bifidobacterium longum*. *Can J Microbiol*, **61**(2), 124-30.
- Maha, M.M., Ali, M.A., Abdel-Rehim, S.E., Abu-Shady, E.A., El-Naggar, B.M., Maha, Y.Z. 2003. The role of coxsackieviruses infection in the children of insulin dependent diabetes mellitus. *J Egypt Public Health Assoc*, **78**(3-4), 305-18.
- Makino, S., Kunitomo, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., Tochino, Y. 1980. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, **29**(1), 1-13.
- Manirarora, J.N., Parnell, S.A., Hu, Y.H., Kosiewicz, M.M., Alard, P. 2011. NOD dendritic cells stimulated with *Lactobacilli* preferentially produce IL-10 versus IL-12 and decrease diabetes incidence. *Clin Dev Immunol*, **2011**, 630187.
- Marco, M.L., Pavan, S., Kleerebezem, M. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol*, **17**(2), 204-10.
- Markle, J.G., Frank, D.N., Mortin-Toth, S., Robertson, C.E., Feazel, L.M., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Danska, J.S. 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, **339**(6123), 1084-8.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M.L., Xaus, J., Fernandez, L., Rodriguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*, **143**(6), 754-8.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol*, **65**(10), 4506-12.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y. 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol*, **93**(1), 109-13.
- Matsushita, M. 2010. Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. *J Innate Immun*, **2**(1), 24-32.
- Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S., Uchida, K., Kato, I., Hashimoto, S., Yokokura, T. 1997. Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS*, **105**(8), 643-9.
- Mattarelli, P., Biavati, B., Alessandrini, A., Crociani, F., Scardovi, V. 1994. Characterization of the plasmid pVS809 from *Bifidobacterium globosum*. *New Microbiol*, **17**(4), 327-31.
- Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C.M., Endo, A., Felis, G.E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L., Dellaglio, F. 2014. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol*, **64**(Pt 4), 1434-51.
- Matteuzzi, D., Sozzi, T. 1971. *Bifidobacterium* bacteriophage from calf rumen. *Z Allg Mikrobiol*, **11**(1), 57-8.
- McCarthy, J., O'Mahony, L., O'Callaghan, L., Sheil, B., Vaughan, E.E., Fitzsimons, N., Fitzgibbon, J., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F. 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*, **52**(7), 975-80.

- Medeiros, J.S., Rivera, M.A., Benigna, M.J., Cardoso, M.A., Costa, M.J. . 2003. Case-control study on early exposure to cow's milk and the occurrence of diabetes mellitus type 1 in Campina Grande in the State of Paraíba. *Rev Bras Saúde Mater Infant*, **3**(pp. 271–280).
- Menard, S., Candalh, C., Bambou, J.C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. 2004. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut*, **53**(6), 821-8.
- Menard, V., Jacobs, H., Jun, H.S., Yoon, J.W., Kim, S.W. 1999. Anti-GAD monoclonal antibody delays the onset of diabetes mellitus in NOD mice. *Pharm Res*, **16**(7), 1059-66.
- Metchnikoff, E. 1908. "The prolongation of life". *Optimistic studies New York: Putman's Sons*(161-183).
- Mielcarek, C., Romond, P.C., Romond, M.B., Bezirtzoglou, E. 2011. Modulation of bacterial translocation in mice mediated through lactose and human milk oligosaccharides. *Anaerobe*, **17**(6), 361-6.
- Mills, S., McAuliffe, O.E., Coffey, A., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. 2006. Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol Rev*, **30**(2), 243-73.
- Miyake, T., Watanabe, K., Watanabe, T., Oyaizu, H. 1998. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol Immunol*, **42**(10), 661-7.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., Clavel, T., Koebsnick, C., Zunft, H.J., Dore, J., Blaut, M. 2006. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol*, **72**(2), 1027-33.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., Otori, H. 2004. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int J Food Microbiol*, **90**(3), 357-62.
- Mullie, C., Odou, M.F., Singer, E., Romond, M.B., Izard, D. 2003. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol Lett*, **222**(1), 129-36.
- Mullie, C., Yazourh, A., Singer, E., Lecroix, F., Blareau, J.P., Romond, M.B., Romond, C. 2002. Partial characterization of *bifidobacterium breve* C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora. *J Dairy Sci*, **85**(6), 1383-9.
- Mullie, C., Yazourh, A., Thibault, H., Odou, M.F., Singer, E., Kalach, N., Kremp, O., Romond, M.B. 2004. Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium longum-infantis* and *Bifidobacterium breve* in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Res*, **56**(5), 791-5.
- Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J.M., Tinahones, F.J., Cardona, F., Soriguer, F., Queipo-Ortuno, M.I. 2013. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med*, **11**, 46.
- Nairn, C., Galbraith, D.N., Taylor, K.W., Clements, G.B. 1999. Enterovirus variants in the serum of children at the onset of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*, **16**(6), 509-13.
- Nakao, Y., Funami, K., Kikkawa, S., Taniguchi, M., Nishiguchi, M., Fukumori, Y., Seya, T., Matsumoto, M. 2005. Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J Immunol*, **174**(3), 1566-73.

- Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., Karlsson, K.A. 2000. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*, **10**(11), 1193-9.
- Neu, J., Reverte, C.M., Mackey, A.D., Liboni, K., Tuhacek-Tenace, L.M., Hatch, M., Li, N., Caicedo, R.A., Schatz, D.A., Atkinson, M. 2005. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **40**(5), 589-95.
- Noble, J.A., Erlich, H.A. 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**(1), a007732.
- O'Connell Motherway, M., Zomer, A., Leahy, S.C., Reunanen, J., Bottacini, F., Claesson, M.J., O'Brien, F., Flynn, K., Casey, P.G., Munoz, J.A., Kearney, B., Houston, A.M., O'Mahony, C., Higgins, D.G., Shanahan, F., Palva, A., de Vos, W.M., Fitzgerald, G.F., Ventura, M., O'Toole, P.W., van Sinderen, D. 2011. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(27), 11217-22.
- O'Driscoll, J., Glynn, F., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2006. Sequence analysis of the lactococcal plasmid pNP40: a mobile replicon for coping with environmental hazards. *J Bacteriol*, **188**(18), 6629-39.
- O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., Quigley, E.M. 2005. *Lactobacillus* and *bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, **128**(3), 541-51.
- Ohishi, A., Takahashi, S., Ito, Y., Ohishi, Y., Tsukamoto, K., Nanba, Y., Ito, N., Kakiuchi, S., Saitoh, A., Morotomi, M., Nakamura, T. 2010. *Bifidobacterium* septicemia associated with postoperative probiotic therapy in a neonate with omphalocele. *J Pediatr*, **156**(4), 679-81.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., Bach, J.F. 2010. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, **160**(1), 1-9.
- Okamoto, M., Benno, Y., Leung, K.P., Maeda, N. 2007. *Metascardovia criceti* Gen. Nov., Sp. Nov., from hamster dental plaque. *Microbiol Immunol*, **51**(8), 747-54.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., Blumberg, R.S. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, **336**(6080), 489-93.
- Orla-Jensen, S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Lait*, **4**(468-474).
- Pak, C.Y., Eun, H.M., McArthur, R.G., Yoon, J.W. 1988. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet*, **2**(8601), 1-4.
- Patelarou, E., Girvalaki, C., Brokalaki, H., Patelarou, A., Androulaki, Z., Vardavas, C. 2012. Current evidence on the associations of breastfeeding, infant formula, and cow's milk introduction with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. *Nutr Rev*, **70**(9), 509-19.
- Patterson, C.C., Dahlquist, G., Soltesz, G., Green, A. 2001. Is childhood-onset type I diabetes a wealth-related disease? An ecological analysis of European incidence rates. *Diabetologia*, **44 Suppl 3**, B9-16.
- Pereira, P.F., Alfenas Rde, C., Araujo, R.M. 2014. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. *J Pediatr (Rio J)*, **90**(1), 7-15.
- Polonovski, M. 1933. Nouvelles acquisitions sur les composés glucidiques du lait de femme. *Bull. Soc. Chim. Biol*, **15**(320-349).

- Poupard, J.A., Husain, I., Norris, R.F. 1973. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev*, **37**(2), 136-65.
- Qian, C., Cao, X. 2013. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci*, **1283**, 67-74.
- Qiao, H., Duffy, L.C., Griffiths, E., Dryja, D., Leavens, A., Rossman, J., Rich, G., Riepenhoff-Talty, M., Locniskar, M. 2002. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr Res*, **51**(6), 750-5.
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B., Collins, J.K. 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr*, **85**(2), 488-96.
- Ray, A., Cot, M., Puzo, G., Gilleron, M., Nigou, J. 2013. Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie*, **95**(1), 33-42.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., Segal, A.W. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, **416**(6878), 291-7.
- Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R., Busscher, H.J. 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, **9**(1), 27-38.
- report, T.L. 2008. Probiotics or con? *The Lancet*, **371**(p624).
- Riedel, C.U., Foata, F., Goldstein, D.R., Blum, S., Eikmanns, B.J. 2006. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells-adhesion and impact on expression profiles. *Int J Food Microbiol*, **110**(1), 62-8.
- Rinne, M.M., Gueimonde, M., Kalliomaki, M., Hoppu, U., Salminen, S.J., Isolauri, E. 2005. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **43**(1), 59-65.
- Roberfroid, M., Slavin, J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **40**(6), 461-80.
- Roesch, L.F., Lorca, G.L., Casella, G., Giongo, A., Naranjo, A., Pionzio, A.M., Li, N., Mai, V., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A., Neu, J., Triplett, E.W. 2009. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME J*, **3**(5), 536-48.
- Romond, M.B., Ais, A., Guillemot, F., Bounouader, R., Cortot, A., Romond, C. 1998. Cell-free whey from milk fermented with *Bifidobacterium breve* C50 used to modify the colonic microflora of healthy subjects. *J Dairy Sci*, **81**(5), 1229-35.
- Romond, M.B., Ais, A., Yazourh, A., Romond, C. 1997a. Cell-free wheys from bifidobacteria fermented milks exert a regulatory effect on the intestinal microflora of mice and humans. *Anaerobe*, **3**(2-3), 137-43.
- Romond, M.B., Colavizza, M., Mullie, C., Kalach, N., Kremp, O., Mielcarek, C., Izard, D. 2008. Does the intestinal bifidobacterial colonisation affect bacterial translocation? *Anaerobe*, **14**(1), 43-8.
- Romond, M.B., Haddou, Z., Mielcarek, C., Romond, C. 1997b. Bifidobacteria and human health: regulatory effect of indigenous bifidobacteria on *Escherichia coli* intestinal colonization. *Anaerobe*, **3**(2-3), 131-6.

- Romond, M.B., Mullie, C., Colavizza, M., Revillion, F., Peyrat, J.P., Izard, D. 2009. Intestinal colonization with bifidobacteria affects the expression of galectins in extraintestinal organs. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **55**(1), 85-92.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Fernandez-Garcia, M., de los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A. 2008. Mucin degradation by Bifidobacterium strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol*, **74**(6), 1936-40.
- Ruiz, L., Coute, Y., Sanchez, B., de los Reyes-Gavilan, C.G., Sanchez, J.C., Margolles, A. 2009. The cell-envelope proteome of Bifidobacterium longum in an in vitro bile environment. *Microbiology*, **155**(Pt 3), 957-67.
- Saitoh, Y., Suzuki, H., Tani, K., Nishikawa, K., Irie, K., Ogura, Y., Tamura, A., Tsukita, S., Fujiyoshi, Y. 2015. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin. *Science*, **347**(6223), 775-8.
- Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M., Benno, Y. 2002. Unification of Bifidobacterium infantis and Bifidobacterium suis as Bifidobacterium longum. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**(Pt 6), 1945-51.
- Salminen, S., Gibson, G.R., McCartney, A.L., Isolauri, E. 2004. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*, **53**(9), 1388-9.
- Samuelsson, U., Carstensen, J., Lofman, O., Nordfeldt, S. 2007. Seasonal variation in the diagnosis of type 1 diabetes in south-east Sweden. *Diabetes Res Clin Pract*, **76**(1), 75-81.
- Sanchez, B., Urdaci, M.C., Margolles, A. 2010. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology*, **156**(Pt 11), 3232-42.
- Sané, F. 2012. Thèse: Infection à Coxsackievirus B4 et Prévention Université Lille 2.
- Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M.G., Tripathi, A., Cucca, F., Lampis, R., Kryszak, D., Carteni, M., Generoso, M., Iafusco, D., Prisco, F., Laghi, F., Riegler, G., Carratu, R., Counts, D., Fasano, A. 2006. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, **55**(5), 1443-9.
- Scardovi, V., Trovatielli, L.D. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus Bifidobacterium. *Ann. Microbiol*, **15**(19-29).
- Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., Arigoni, F. 2002. The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(22), 14422-7.
- Schleifer, K.H., Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, **36**(4), 407-77.
- Schroder, N.W., Heine, H., Alexander, C., Manukyan, M., Eckert, J., Hamann, L., Gobel, U.B., Schumann, R.R. 2004. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol*, **173**(4), 2683-91.
- Schubert, K., Bichlmaier, A.M., Mager, E., Wolff, K., Ruhland, G., Fiedler, F. 2000. P45, an extracellular 45 kDa protein of Listeria monocytogenes with similarity to protein p60 and exhibiting peptidoglycan lytic activity. *Arch Microbiol*, **173**(1), 21-8.
- Scuotto, A., Djorie, S., Colavizza, M., Romond, P.C., Romond, M.B. 2014. Bifidobacterium breve C50 secretes lipoprotein with CHAP domain recognized in aggregated form by TLR2. *Biochimie*, **107 Pt B**, 367-75.
- Secondulfo, M., Iafusco, D., Carratu, R., deMagistris, L., Sapone, A., Generoso, M., Mezzogiomo, A., Sasso, F.C., Carteni, M., De Rosa, R., Prisco, F., Esposito, V. 2004.

- Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Dig Liver Dis*, **36**(1), 35-45.
- See, D.M., Tilles, J.G. 1995. Pathogenesis of virus-induced diabetes in mice. *J Infect Dis*, **171**(5), 1131-8.
- Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M., Mills, D.A. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(48), 18964-9.
- Sgorbati, B., Scardovi, V., Leblanc, D.J. 1982. Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *J Gen Microbiol*, **128**(9), 2121-31.
- Shenderov, B.A. 2013. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microb Ecol Health Dis*, **24**.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T., Tomita, M. 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J Dairy Sci*, **75**(12), 3296-306.
- Simpson, P.J., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**(Pt 2), 401-6.
- Skerman, V. 1980. Approved lists of bacterial names
Int J Syst Bacteriol, **30**(225-420).
- Soltesz, G., Patterson, C.C., Dahlquist, G. 2007. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes*, **8 Suppl 6**, 6-14.
- Stahl, B., Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Finke, B., Sawatzki, G. 2001. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol*, **501**, 299-306.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., Ross, R.P. 2001. Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr*, **73**(2 Suppl), 476S-483S.
- Steck, A.K., Rewers, M.J. 2011. Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem*, **57**(2), 176-85.
- Stowell, S.R., Arthur, C.M., Mehta, P., Slanina, K.A., Blixt, O., Leffler, H., Smith, D.F., Cummings, R.D. 2008. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem*, **283**(15), 10109-23.
- Strachan, D.P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, **299**(6710), 1259-60.
- Sun, Z., Zhang, W., Guo, C., Yang, X., Liu, W., Wu, Y., Song, Y., Kwok, L.Y., Cui, Y., Menghe, B., Yang, R., Hu, L., Zhang, H. 2015. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: a snapshot of its genetic diversity and evolution. *PLoS One*, **10**(2), e0117912.
- Szajewska, H., Setty, M., Mrukowicz, J., Guandalini, S. 2006. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **42**(5), 454-75.
- Takeuchi, O., Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, **140**(6), 805-20.
- Teng, F., Singh, K.V., Bourgogne, A., Zeng, J., Murray, B.E. 2009. Further characterization of the epa gene cluster and Epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, **77**(9), 3759-67.
- Thibault, H., Aubert-Jacquín, C., Goulet, O. 2004. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **39**(2), 147-52.

- Tiittanen, M., Westerholm-Ormio, M., Verkasalo, M., Savilahti, E., Vaarala, O. 2008. Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*, **152**(3), 498-507.
- Tissier, H. 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. in: *Thèse, University of Paris, Paris, France*.
- Torres-Aviles, F., Carrasco, E., Icaza, G., Perez-Bravo, F. 2010. Clustering of cases of type 1 diabetes in high socioeconomic communes in Santiago de Chile: spatio-temporal and geographical analysis. *Acta Diabetol*, **47**(3), 251-7.
- Triantafilou, M., Lepper, P.M., Olden, R., Dias, I.S., Triantafilou, K. 2011. Location, location, location: is membrane partitioning everything when it comes to innate immune activation? *Mediators Inflamm*, **2011**, 186093.
- Tsujimura, M., Miyazaki, T., Kojima, E., Sagara, Y., Shiraki, H., Okochi, K., Maeda, Y. 2002. Serum concentration of Hakata antigen, a member of the ficolins, is linked with inhibition of *Aerococcus viridans* growth. *Clin Chim Acta*, **325**(1-2), 139-46.
- Turroni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J.H., Zomer, A., Sanchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G.F., Mills, D., Margolles, A., Kelly, D., van Sinderen, D., Ventura, M. 2010a. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(45), 19514-9.
- Turroni, F., Foroni, E., O'Connell Motherway, M., Bottacini, F., Giubellini, V., Zomer, A., Ferrarini, A., Delledonne, M., Zhang, Z., van Sinderen, D., Ventura, M. 2010b. Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. *Appl Environ Microbiol*, **76**(10), 3206-19.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D.A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M.J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., Gueimonde, M., Margolles, A., De Bellis, G., O'Toole, P.W., van Sinderen, D., Marchesi, J.R., Ventura, M. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One*, **7**(5), e36957.
- Turroni, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O'Connell Motherway, M., Taverniti, V., Mangifesta, M., Milani, C., Viappiani, A., Roversi, T., Sanchez, B., Santoni, A., Gioiosa, L., Ferrarini, A., Delledonne, M., Margolles, A., Piazza, L., Palanza, P., Bolchi, A., Guglielmetti, S., van Sinderen, D., Ventura, M. 2013. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(27), 11151-6.
- Ueno, H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J.Mol. Catalysis B.: Enzymatic*, **67-79**(10).
- Vaarala, O., Atkinson, M.A., Neu, J. 2008. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes*, **57**(10), 2555-62.
- Vael, C., Nelen, V., Verhulst, S.L., Goossens, H., Desager, K.N. 2008. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BMC Pulm Med*, **8**, 19.
- Valladares, R., Sankar, D., Li, N., Williams, E., Lai, K.K., Abdelgeliel, A.S., Gonzalez, C.F., Wasserfall, C.H., Larkin, J., Schatz, D., Atkinson, M.A., Triplett, E.W., Neu, J., Lorca, G.L. 2010. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS One*, **5**(5), e10507.
- van den Broek, L.A., Hinz, S.W., Beldman, G., Vincken, J.P., Voragen, A.G. 2008. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Mol Nutr Food Res*, **52**(1), 146-63.

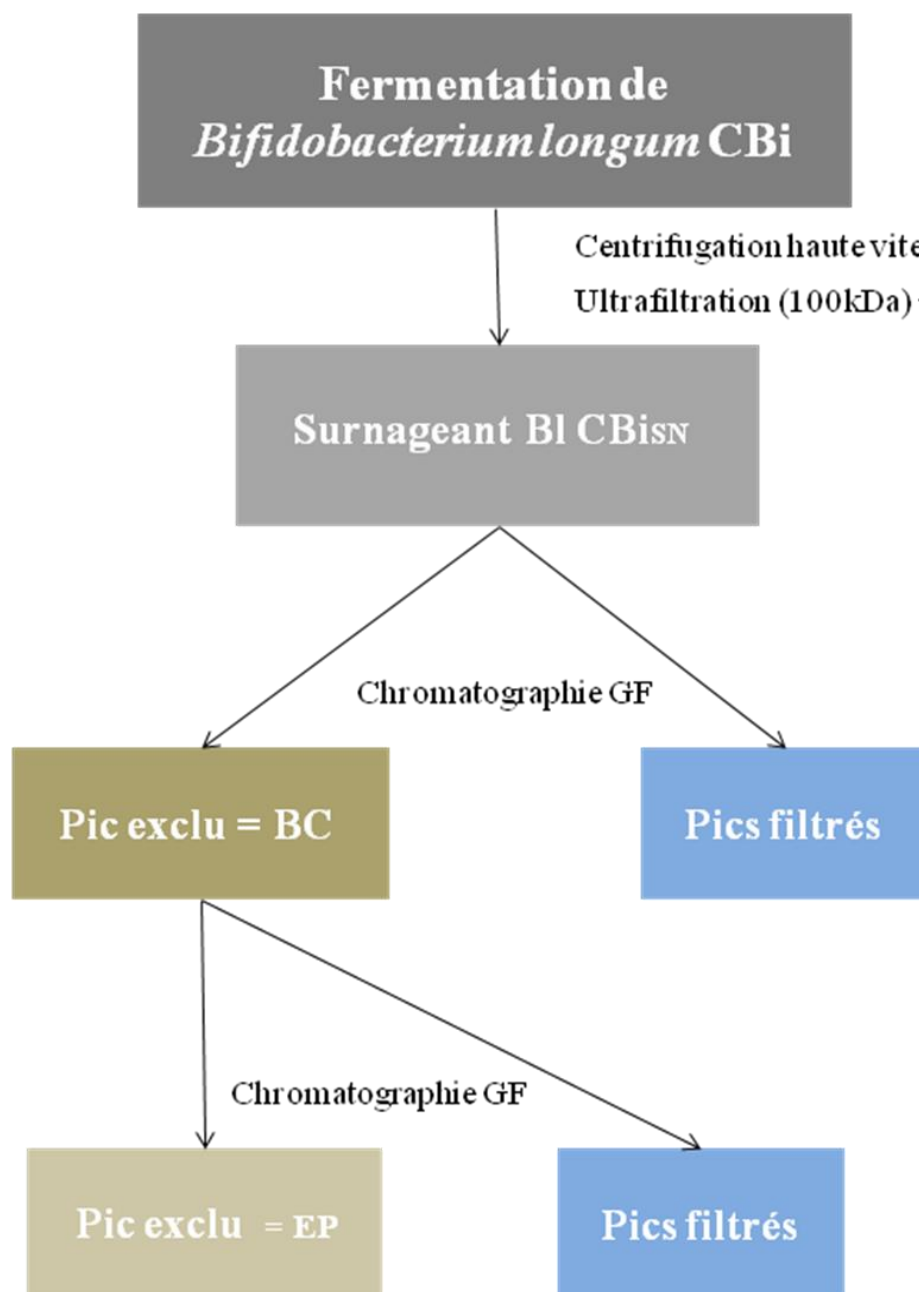
- Van Tassell, M.L., Miller, M.J. 2011. Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, **3**(5), 613-36.
- Veerkamp, J.H. 1971. The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Arch Biochem Biophys*, **143**(1), 204-11.
- Ventura, M., Canchaya, C., Del Casale, A., Dellaglio, F., Neviani, E., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2006a. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**(Pt 12), 2783-92.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., van Sinderen, D. 2007a. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**(4), 351-72.
- Ventura, M., Canchaya, C., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F., Zink, R. 2004. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp* (*atpBEFHAGDC*) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Appl Environ Microbiol*, **70**(5), 3110-21.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2006b. How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev*, **30**(5), 734-59.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2007b. Molecular characterization of *hsp20*, encoding a small heat shock protein of *bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol*, **73**(14), 4695-703.
- Ventura, M., Lee, J.H., Canchaya, C., Zink, R., Leahy, S., Moreno-Munoz, J.A., O'Connell-Motherway, M., Higgins, D., Fitzgerald, G.F., O'Sullivan, D.J., van Sinderen, D. 2005a. Prophage-like elements in bifidobacteria: insights from genomics, transcription, integration, distribution, and phylogenetic analysis. *Appl Environ Microbiol*, **71**(12), 8692-705.
- Ventura, M., Turrioni, F., Foroni, E., Duranti, S., Giubellini, V., Bottacini, F., van Sinderen, D. 2010. Analyses of bifidobacterial prophage-like sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **98**(1), 39-50.
- Ventura, M., Turrioni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M.J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R.S., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G.F., O'Toole, P.W., van Sinderen, D. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genet*, **5**(12), e1000785.
- Ventura, M., Turrioni, F., van Sinderen, D. 2015. *Bifidobacteria of the Human Gut: Our Special Friends Diet-Microbe Interactions in the Gut Effects on Human Health and Disease ed.*
- Ventura, M., Zink, R. 2003. Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Appl Environ Microbiol*, **69**(12), 7517-22.
- Ventura, M., Zink, R., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2005b. Gene structure and transcriptional organization of the *dnaK* operon of *Bifidobacterium breve* UCC 2003 and application of the operon in bifidobacterial tracing. *Appl Environ Microbiol*, **71**(1), 487-500.
- Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int J Food Microbiol*, **116**(3), 325-31.

- Wacklin, P., Makivuokko, H., Alakulppi, N., Nikkila, J., Tenkanen, H., Rabina, J., Partanen, J., Aranko, K., Matto, J. 2011. Secretor genotype (FUT2 gene) is strongly associated with the composition of Bifidobacteria in the human intestine. *PLoS One*, **6**(5), e20113.
- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T., Yamamoto, K. 2008. Bifidobacterium bifidum lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol*, **74**(13), 3996-4004.
- Wang, Y., Mai, T., Liu, M.F., Chen, S.H. 2007. [Effect of lipoteichoic acid of Bifidobacterium on survivin and its regulatory genes]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **29**(5), 325-8.
- Wasano, K., Hirakawa, Y. 1997. Recombinant galectin-1 recognizes mucin and epithelial cell surface glycocalyxes of gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem*, **45**(2), 275-83.
- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M.H., van Neerven, R.J., Nauta, A., van Sinderen, D. 2013. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol*, **114**(4), 1132-46.
- Wei, X., Yan, X., Chen, X., Yang, Z., Li, H., Zou, D., He, X., Wang, S., Cui, Q., Liu, W., Zhurina, D., Wang, X., Zhao, X., Huang, L., Zeng, M., Ye, Q., Riedel, C.U., Yuan, J. 2014. Proteomic analysis of the interaction of Bifidobacterium longum NCC2705 with the intestine cells Caco-2 and identification of plasminogen receptors. *J Proteomics*, **108**, 89-98.
- Weiss, G., Christensen, H.R., Zeuthen, L.H., Vogensen, F.K., Jakobsen, M., Frokiaer, H. 2011. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon-beta profiles in dendritic cells. *Cytokine*, **56**(2), 520-30.
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., Chervonsky, A.V. 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, **455**(7216), 1109-13.
- Wilson, M. 2008. *Bacteriology of humans, an ecological perspective*.
- Yagi, H., Matsumoto, M., Kunitomo, K., Kawaguchi, J., Makino, S., Harada, M. 1992. Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol*, **22**(9), 2387-93.
- Yi, Z.J., Fu, Y.R., Li, M., Gao, K.S., Zhang, X.G. 2009. Effect of LTA isolated from bifidobacteria on D-galactose-induced aging. *Exp Gerontol*, **44**(12), 760-5.
- Ylipaasto, P., Klingel, K., Lindberg, A.M., Otonkoski, T., Kandolf, R., Hovi, T., Roivainen, M. 2004. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*, **47**(2), 225-39.
- Yoon, J.W., Jun, H.S. 2001. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, **928**, 200-11.
- Yoon, J.W., Jun, H.S., Santamaria, P. 1998. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, **27**(2), 109-22.
- Young, S.L., Simon, M.A., Baird, M.A., Tannock, G.W., Bibiloni, R., Spencely, K., Lane, J.M., Fitzharris, P., Crane, J., Town, I., Addo-Yobo, E., Murray, C.S., Woodcock, A. 2004. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol*, **11**(4), 686-90.
- Youssef, M., Muller-Beuthow, W., Haenel, H. 1966. [Isolation of bacteriophages for anaerobic lactobacilli from human feces]. *Naturwissenschaften*, **53**(22), 589-90.

- Zeng, J., Teng, F., Weinstock, G.M., Murray, B.E. 2004. Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *J Clin Microbiol*, **42**(3), 1149-54.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., Frokiaer, H. 2008. Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology*, **124**(4), 489-502.
- Zhao, J., Cheung, P.C. 2013. Comparative proteome analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* grown on beta-glucans from different sources and a model for their utilization. *J Agric Food Chem*, **61**(18), 4360-70.
- Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**(Pt 3), 589-608.
- Zhurina, D., Zomer, A., Gleinser, M., Brancaccio, V.F., Auchter, M., Waidmann, M.S., Westermann, C., van Sinderen, D., Riedel, C.U. 2011. Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17. *J Bacteriol*, **193**(1), 301-2.
- Zivkovic, A.M., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A. 2011. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108 Suppl 1**, 4653-8.
- Zomer, A., Fernandez, M., Kearney, B., Fitzgerald, G.F., Ventura, M., van Sinderen, D. 2009. An interactive regulatory network controls stress response in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *J Bacteriol*, **191**(22), 7039-49.

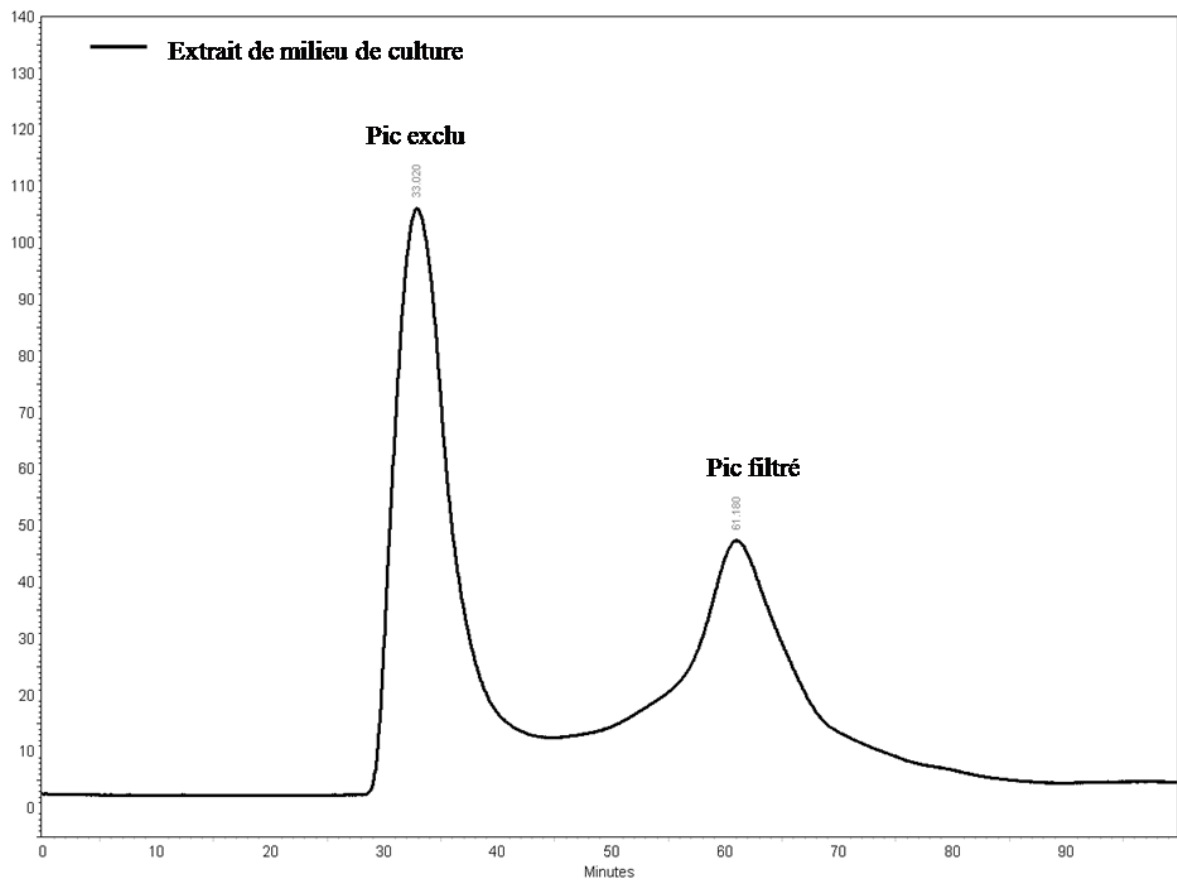
Annexes

Annexe I



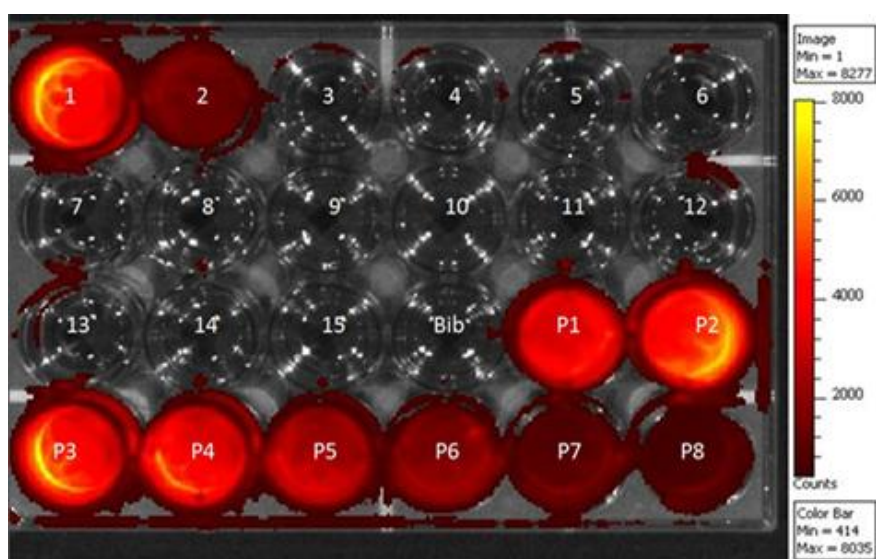
Annexe I: Isolement des composés bifides. Le surnageant BI CBi_{SN} est obtenu après centrifugation à haute vitesse et ultrafiltration de la fermentation de la souche de *B. longum* CBI. Les composés bifides sont issus de la filtration du surnageant par chromatographie de gel filtration (GF) et correspondent au pic exclu. Une nouvelle filtration par chromatographie GF des BC permet de déterminer la stabilité des agrégats bifides et le pic exclu observé est nommé EP.

Annexe II

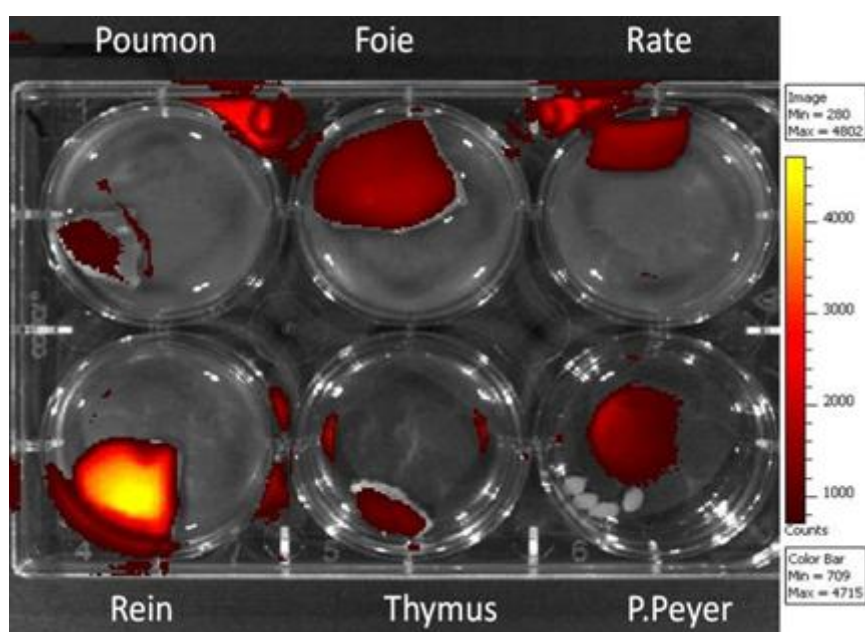


Annexe II : Chromatographie de gel filtration des extraits de milieu de culture. 1,5mg de milieu de culture préparé comme décrit dans le chapitre 3 (3.2.1). On observe la présence d'un pic exclu ($rt=33min$) correspondant et d'un pic filtré ($rt=61min$). Le pic exclu représentant des agrégats probablement formés par les protéines de lactosérum présent dans le milieu possède une aire de 61% de l'aire totale sous les pics.

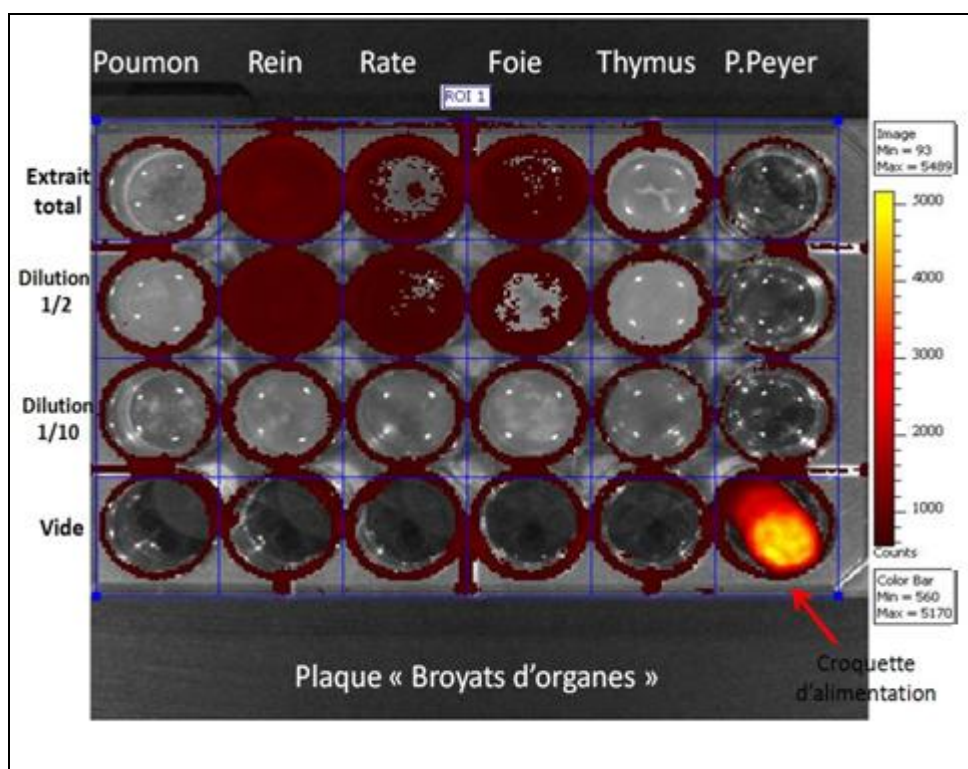
Annexe III



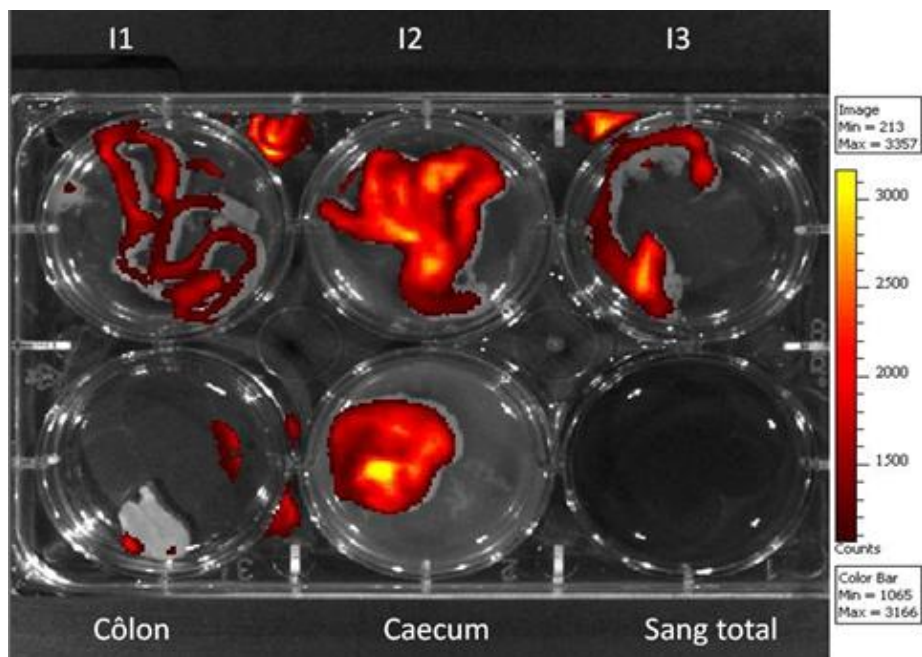
Annexe III-A : Plaque « sensibilité de la méthode ». Puits 1 à 14 : dilution 2 en 2 de BI CBI0703_{BC} marqué au CF750 (solution mère = puit 1= 1mg/ml). On observe la perte totale d'émission de fluorescence à partir du puit 3 (BICBI0703BC= 0,25mg/ml); Puits 15 tampon carbonate (1M) utilisé pour le marquage ; Bib= solution de BI CBI0703BC marqués au CF-750 à 0,6mg/L issues du biberon administré au rat ne montre aucune fluorescence ; P1 à P8 perméats de lavages issues du marquage des agrégats. Le gradient d'intensité de fluorescence varie du jaune (très intense) au rouge (très faible).



Annexe III-B : « Plaques organes ». Ces organes sont issus d'un rat ayant reçu les agrégats CBI0703BC marqués au CF750 une nuit dans le biberon à la dose 0,6mg/L. On observe une fluorescence intense dans le rein alors que pour le thymus, le foie et la rate l'intensité est plus faible.



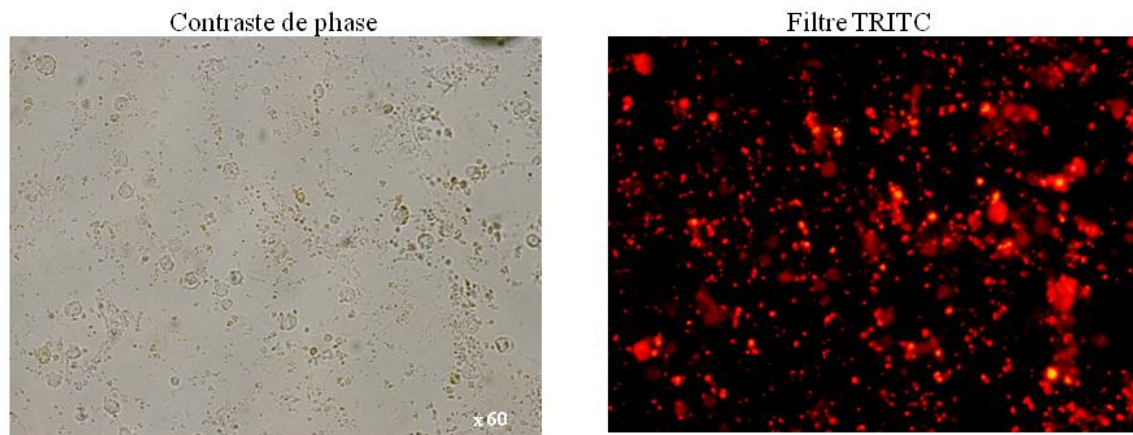
Annexe III-C : Plaque broyats d'organes. Les organes ont été broyés et tamisés pour obtenir des suspensions cellulaires. On observe une fluorescence dans le rein, la rate et le foie. Fait intéressant, la croquette d'alimentation RO3-40 administrée au rat présente une fluorescence très intense.



Annexe III-D : Plaque intestin. On observe une fluorescence importante dans les fractions de l'iléon (I1, I2, I3) ainsi que dans le caecum. Le côlon et le sang ne semble pas présenter de fluorescence.

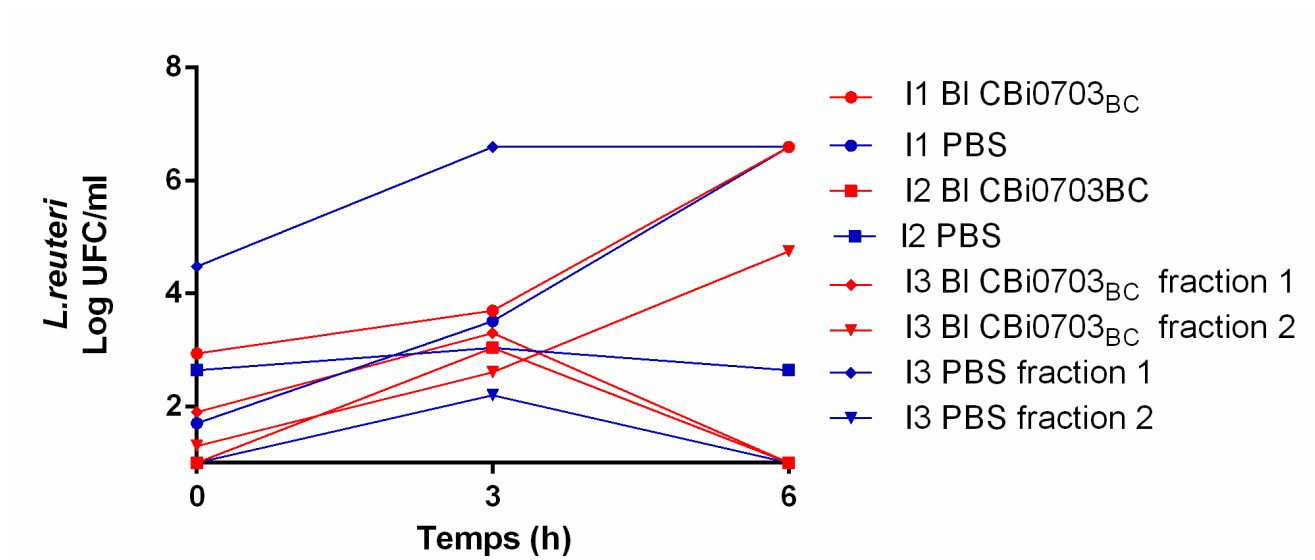
Annexe IV

Souris NOD (non gavées avec les agrégats marqués)



Rate - cellules dendritiques Cd11c

Annexe IV : Analyse par microscopie à fluorescence des cellules dendritiques Cd11c spléniques. La souris NOD témoin (eau) n'ayant reçu aucun composé marqué présentent une autofluorescence très importante sous le filtre TRITC. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une mortalité cellulaire élevée observable sous contraste de phase.



Annexe V : Variation de la population de *L.reuteri* au cours du temps dans les différentes fractions intestinales. Les taux de *L.reuteri* des fragments supplémentés avec les agrégats sont présentés en rouge et ceux en PBS sont de couleur bleu.